



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO RETROSPETIVO DE SURTO DE CASOS DE DOENÇA DO NEURÓNIO MOTOR
DOS EQUINOS EM PORTUGAL

JOÃO FILIPE FELÍCIO LUÍS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Almeida Ferreira

Doutora Maria Rita Martins Garcia da Fonseca

Dra. Mónica Alexandra Freire Cardoso de Mira

ORIENTADOR

Dra. Mónica Alexandra Freire Cardoso de Mira

CO-ORIENTADOR

Doutora Paula Alexandra Botelho Garcia
de Andrade Pimenta Tilley

2014

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO RETROSPETIVO DE SURTO DE CASOS DE DOENÇA DO NEURÓNIO MOTOR
DOS EQUINOS EM PORTUGAL

JOÃO FILIPE FELÍCIO LUÍS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Almeida Ferreira

Doutora Maria Rita Martins Garcia da Fonseca

Dra. Mónica Alexandra Freire Cardoso de Mira

ORIENTADOR

Dra. Mónica Alexandra Freire Cardoso de Mira

CO-ORIENTADOR

Doutora Paula Alexandra Botelho Garcia
de Andrade Pimenta Tilley

2014

LISBOA

Aos Meus Pais,

Obrigado por me terem proporcionado este sonho.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Mónica Mira e ao Dr. Tomé Fino, pelo contributo na minha evolução e aprendizagem na Medicina Veterinária de Equinos. Obrigado pelas oportunidades que me proporcionaram e por todos os momentos de amizade. Certamente amigos no futuro.

À Professora Doutora Paula Tilley pelo empenho que depositou no meu projeto, permitindo que este fosse levado a cabo com sucesso. Pelos conselhos e sugestões durante a realização desta dissertação.

A toda a equipa da Unidade Equina do Hospital Clínico Veterinário da Universidade Autónoma de Barcelona, pelos ensinamentos transmitidos. Por contribuírem permanentemente para minha integração e bem-estar num país diferente.

À Mestre Maria João Fradinho pela paciência e gentileza, pela enorme disponibilidade com que colaborou na realização desta dissertação.

Ao Dr. Hugo Pissarra pela vontade de ajudar, pelo esclarecimento de dúvidas na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Mário Quaresma pela ajuda na compreensão de alguns temas abordados.

Ao Dr. José Fontes pela forma como me recebeu em sua casa, pelo empenho e dedicação em colaborar sempre que necessário. Por disponibilizar a informação relativa aos seus animais.

À Marta Tobar pelos conselhos e compreensão, pela boa disposição e disponibilidade em ajudar.

À enfermeira Cláudia Ribeiro pela sua disponibilidade e paciência, pelo contributo na integração dos trabalhos desenvolvidos em equipa.

À minha mãe e ao meu pai, pelos valores transmitidos, pelo apoio incondicional demonstrado ao longo do meu percurso académico, sem eles não seria possível atingir este objetivo.

Ao meu querido irmão que muita paciência exigiu.

A Marlene pela paciência e compreensão quase sempre demonstradas, pelo apoio nos momentos mais difíceis.

À minha família por todo o carinho e apoio, por sempre me incentivarem a seguir em frente.

A todos os meus amigos pelos bons momentos que proporcionaram, por estarem sempre presentes e contribuírem para o sucesso deste projeto.

ESTUDO RETROSPECTIVO DE SURTO DE CASOS DE DOENÇA DO NEURÓNIO MOTOR DOS EQUINOS EM PORTUGAL

RESUMO

A doença do neurónio motor dos equinos (DNME) foi descrita pela primeira vez nos EUA em meados dos anos 90. Desde então, registou-se um aumento de relatos de casos em todo o mundo. Hoje sabe-se que é uma doença de carácter multifatorial e que a carência em vitamina E desempenha um papel fundamental no seu desenvolvimento, principalmente em cavalos sem acesso à pastagem.

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo retrospectivo de oito casos de DNME, identificados em cavalos sem acesso à pastagem sujeitos ao mesmo regime alimentar, no período de 2007-2009 em Portugal. Pretendeu-se ainda, fornecer uma noção geral da quantidade de vitamina E que pode ser disponibilizada a cavalos recorrendo a alimentos compostos e alimentos compostos complementares para equinos, existentes no mercado português.

Para tal, foram recolhidas informações referentes ao manejo alimentar a que os equinos estavam sujeitos e documentada a sintomatologia clínica, as análises laboratoriais realizadas e o procedimento de diagnóstico. Adicionalmente, escolheram-se 3 alimentos compostos e 3 alimentos compostos complementares disponíveis no mercado português de forma a fazer a estimativa da quantidade de vitamina E que estes fornecem. Posteriormente comparou-se a quantidade de vitamina E estimada, disponibilizada por alguns destes alimentos, quando fornecidos a cavalos com diferentes níveis de actividade física de acordo com o sugerido pelo *National Research Council* (2007).

Verificou-se que os equinos apresentavam um conjunto de sinais clínicos coincidentes com DNME, nomeadamente perda de peso, elevação da base da cauda, cabeça em posição inferior e mudança frequente de peso entre os membros pélvicos.

O resultado da análise histopatológica realizada às amostras de tecido muscular e nervoso, foi compatível com DNME.

Como noutras partes do mundo, a DNME existe em Portugal. A sua sintomatologia inicial é inespecífica, o que leva a que esta doença seja sub-diagnosticada em muitos casos. É importante alertar os proprietários para a sua ocorrência principalmente em cavalos sem acesso à pastagem e sensibilizar os médicos veterinários para a importância da vitamina E na dieta dos equinos.

Palavras-chave: doença do neurónio motor dos equinos, DNME, vitamina E, pastagem.

RETROSPECTIVE STUDY OF OUTBREAK CASES OF EQUINE MOTOR NEURON DISEASE IN PORTUGAL

ABSTRACT

Equine motor neuron disease (EMND) was first described in the USA in the mid 90s. Since then, there has been an increase in cases worldwide. Nowadays, we know that it is a multifactorial disease. Vitamin E plays a fundamental role in its development, especially in horses lacking access to pasture.

The aim of this study was to perform a retrospective study of eight cases of EMND, which was identified in horses without access to pasture and subjected to the same diet, from 2007 to 2009, in Portugal. It was intended to also provide a general idea of the vitamin E amount that can be supplied to horses using food compounds and complementary food compounds for horses, amongst the ones available in the Portuguese market.

For this, information relative to the horses' dietary habits and the documented clinical symptoms, laboratory tests and diagnostic procedures, was collected. Additionally, I chose 3 compounds feed and 3 complementary compounds feed from the Portuguese market in order to make an estimate of the amount of vitamin E they provide. Subsequently I compared the amount of vitamin E estimated, provided by these feed, as they would be supplied to horses with different levels of physical activity according to the suggestions made by the National Research Council (2007).

The horses presented with a set of clinical signs which was coincidental with EMND, namely weight loss, elevated tail-head, head in lowered position and constant weight shift between hind-limbs.

The results of the histopathological analysis of muscle and nervous tissue samples were compatible with equine motor neuron disease.

EMND exists in Portugal, as elsewhere in the world. The initial clinical signs are non-specific, which leads to underdiagnosis in many cases. It is important to alert owners of the possibility of its occurrence, especially in horses without access to pasture and to increase veterinarians' awareness of the significance of vitamin E in the horses' diet.

Keywords: equine motor neuron disease, EMND, vitamin E, pasture.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE GERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO	1
INTRODUÇÃO	4
I. SISTEMA NERVOSO	5
1. SISTEMA NERVOSO CENTRAL	6
2. SISTEMA NERVOSO AUTONOMO	6
3. SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO	7
4. MEDULA ESPINHAL	7
5. TRONCO CEREBRAL	8
6. NERVOS PERIFÉRICOS	8
6.1. Nervos Cranianos	9
6.2. Nervos Espinhais	9
7. NEURÓNIO	10
7.1. Neurónios Motores Inferiores	10
7.1.1 Sinais clínicos de lesões do Neurónio Motor Inferior	11
8. DEGENERESCÊNCIA WALLERIANA	11
9. EXAME NEUROLÓGICO	12
II. VITAMINA E	14
1. ESTRUTURA QUÍMICA E PROPRIEDADES	15
2. STRESS OXIDATIVO	15
3. PAPEL DA VITAMINA E	17
4. ABSORÇÃO, METABOLISMO E EXCRECÇÃO	18
4.1. Absorção pela Barreira Hematoencefálica (BHE)	19
5. INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA AS CONCENTRAÇÕES DE α -TOCOFEROL NO PLASMA E SORO DE EQUINOS	20
6. CARÊNCIA DE VITAMINA E – DOENÇAS ASSOCIADAS	21
6.1. Mieloencefalopatia Degenerativa Equina	21
6.2. Miopatia Por Carência de Vitamina E	22
7. SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA E	23
7.1. Fontes Sintéticas	24
7.2. Fontes Naturais	24
7.3. Suplementação em Cavalos Saudáveis	25
7.4. Suplementação em Cavalos com Doenças Neurológicas	27
8. TOXICIDADE	28
III. DOENÇA DO NEURÓNIO MOTOR DOS EQUINOS	29
1. HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA	30
2. FISIOPATOLOGIA	33
3. SINAIS CLÍNICOS	35
3.1. Forma Subaguda	35
3.2. Forma Crónica	37
3.3. Forma Subclínica	38
4. ALTERAÇÕES OCULARES	38
5. EXAMES COMPLEMENTARES	39
5.1. Absorção / Metabolismo da Glucose	40
5.2. Eletromiografia	40
5.3. Biópsia Nervosa e Muscular	41
6. DIAGNÓSTICO	43
6.1. <i>Antemorten</i>	43

6.2. <i>Postmortem</i>	44
7. PREVENÇÃO	45
8. TRATAMENTO	45
9. PROGNÓSTICO.....	46
IV. ESTUDO	48
1. OBJECTIVO	49
2. MATERIAIS E MÉTODOS	49
2.1. Amostra do estudo	49
2.2. História Clínica	49
2.2.1. Período de estabulação.....	49
2.2.2. Maneio alimentar.....	50
2.2.3. Actividade física	50
2.3. Exame Clínico	50
2.4. Exames Complementares	50
2.4.1. Análise das amostras de sangue.....	50
2.4.2. Análise das biópsias musculares.....	51
2.5. Exame <i>Postmortem</i>	51
2.6. Estimativa da quantidade de vitamina E presente em alimentos compostos e alimentos compostos complementares disponíveis no mercado português.....	51
2.6.1. Comparação da quantidade de vitamina E estimada previamente que é disponibilizada por alguns AC, quando fornecidos a cavalos com diferentes níveis de actividade física de acordo com o sugerido pelo National Research Council (2007). .	51
2.7. Análise de dados.....	52
3. RESULTADOS	52
3.1. Amostra do estudo	52
3.2. História Clínica	52
3.2.1. Período de estabulação.....	53
3.2.2. Maneio alimentar.....	54
3.2.3. Actividade física	55
3.3. Exame Clínico	56
3.4. Exames Complementares	57
3.4.1. Análise das amostras de sangue.....	57
3.4.2. Análise das biópsias musculares.....	58
3.5. Exame <i>Postmortem</i>	59
3.6. Estimativa da quantidade de vitamina E presente em alimentos compostos e alimentos compostos complementares disponíveis no mercado português.....	60
3.6.1. Comparação da quantidade de vitamina E estimada previamente que é disponibilizada por alguns AC, quando fornecidos a cavalos com diferentes níveis de actividade física de acordo com o sugerido pelo National Research Council (2007). .	61
4. DISCUSSÃO	63
4.2. Limitações do Estudo	74
5. CONCLUSÃO	75
BIBLIOGRAFIA.....	77
Furr, M., & Reed, S. M. (2008). <i>Equine neurology</i> . Ames, Iowa: Blackwell Pub.	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Secção transversal da medula espinhal torácica, ilustrando os nervos espinhais e seus componentes (Adaptado de Thomson, 2012).	8
Figura 2. Representação dos nervos cranianos originados no núcleo ambíguos, responsáveis pela enervação da laringe, faringe e esófago (Adaptado de Thomson, 2012).	9
Figura 3. Degenerescência Walleriana de um neurónio motor inferior (Adaptado de DeLahunta & Glass, 2009).	12
Figura 4. Mecanismo antioxidante de combate à peroxidação lipídica (Adaptado de Wong et al., 2012).	18
Figura 5. Cavalos Lusitano com sintomatologia de DNME. Observa-se elevação da base da cauda (A) e atrofia muscular na zona dos músculos glúteos, músculos quadrícepedes e musculatura da base da cauda - Original.	36
Figura 6. Cavalos Lusitano com sintomatologia de DNME. Observa-se elevada perda de massa muscular e os membros encontram-se bastante concentrados adotando uma postura de “base estreita” (Miguel Minas e Tomé Fino, 2007 – Publicação autorizada).	37
Figura 7. Movimento de harpejo executado por um equino de raça Lusitana severamente afectado pela DNME (Miguel Minas e Tomé Fino, 2007 – Publicação autorizada).	37
Figura 8. Locais onde são efetuadas biópsias dos músculos sacrococcígeo dorsal medial (A), glúteo médio (B) e longo dorsal (C), para posterior análise histopatológica (Miguel Minas e Tomé Fino, 2007 – Publicação autorizada).	42
Figura 9. Equino Lusitano com DNME, no qual é evidente a perda de massa muscular e a adoção de uma postura com a cabeça ao nível dos ombros, características desta doença – Original.	57
Figura 10. Equino Lusitano galopando com os membros pélvicos quase em simultâneo (galope de coelho) e com a cauda levantada, sintomas característicos da DNME – Original.	57
Figura 11. Aspetos histopatológicos do corno ventral da medula espinhal do “equino 8” (H&E x 400) (H. Pissarra, comunicação pessoal, Novembro 14, 2013 – Publicação autorizada).	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Várias formas de suplementação com α -tocoferol são fornecidas com os seus componentes e potência relativa (UI / mg), quando comparada com a forma standard - (DL) all-rac- α -Tocoferol (Adaptado de European Union Register of Feed Additives, 2013; C.J. Finno & Valberg, 2012).	24
Tabela 2. Quantidade de vitamina E (UI / kg de PV) recomendada para diferentes classes de equinos, com ingestão diária de MS na ordem dos 2-2,25 %, segundo o NRC (2007).	27
Tabela 3. Dados descritivos em relação ao “Período de estabulação”.	54
Tabela 4. Enzimas AST, CK, LDH com valores alterados, identificados e registados durante as análises bioquímicas efetuadas ao sangue de 6 equinos pertencentes à amostra do estudo.	58
Tabela 5. Quantidade de vitamina E aditivada em alimentos compostos para equinos, considerando diferentes gamas de 3 marcas distintas, disponíveis no mercado português.	60
Tabela 6. Quantidade de vitamina E fornecida em cada dose diária (recomendação de acordo com o respetivo rótulo), de 3 ACC disponíveis no mercado português.	61
Tabela 7. Estimativa da quantidade de vitamina E fornecida pelo regime alimentar constituído por feno (qualidade média – 14 mg de α -tocoferol / MS) e por diferentes alimentos compostos, considerando 2 cavalos com diferentes necessidades diárias de α -tocoferol.	61
Tabela 8. Necessidades diárias de vitamina E, num cavalo de 500 kg de PV com diferentes níveis de esforço físico, de acordo com o recomendado pelo NRC (2007).	72

Tabela 9. Necessidades diárias de vitamina E, num cavalo de 500 kg de PV com diferentes níveis de esforço físico, de acordo com o recomendado pelo INRA (Martin-Rosset, 2012)..	72
Tabela 10. Necessidades diárias de vitamina E, em éguas de 500 kg de PV, em diferentes momentos do ciclo reprodutivo (Adaptado de Martin-Rosset, 2012).	73
Tabela 11. Necessidades diárias de vitamina E, em poldros de várias idades com perspetiva de atingirem 500 kg de PV na idade adulta (Martin-Rosset, 2012).....	73

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Frequência dos sinais clínicos descritos por proprietários, em 32 casos de DNME na Europa (Adaptado de McGorum et al., 2006).	38
Gráfico 2. Distribuição do número de meses de trabalho à guia e trabalho montado, decorridos entre o início do regime de estabulação e o aparecimento dos primeiros sinais clínicos associados a DNME.....	56
Gráfico 3. Produtividade anual de pastagens de sequeiro e regadio em Portugal (M. Fradinho, comunicação pessoal, Outubro 30, 2013 - Adaptado de Salgueiro, 1982).	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	alimento composto
ACC	alimentos compostos complementares
Ach	acetilcolina
AST	aspartato aminotransferase
BHE	barreira hematoencefálica
CC	condição corporal
Ck	creatina quinase
Cu	cobre
DMSO	dimetilsulfóxido
DNM	doença do neurónio motor
DNA	distrofia neuroaxonal
DNME	doença do neurónio motor em equinos
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EMG	eletromiografia
ELA	esclerose lateral amiotrófica
EPR	epitélio pigmentado da retina
EROs	espécies reativas de oxigénio
FC	frequência cardíaca
Fe	ferro
FEI	Federação Equestre Internacional
FR	frequência respiratória
GA	gama alta
GB	gama baixa
GPx	peroxidase glutationa
INRA	<i>Institut National de la Recherche Agronomique</i>
HCV-UAB	Hospital Clínico Veterinário da Universidade Autónoma de Barcelona
HDL	lipoproteínas de alta densidade
kg	quilograma
LCR	líquido cefalorraquidiano
LDH	lactato desidrogenase
LLP	lipases das lipoproteínas
MDE	mieloencefalopatia degenerativa equina
mg	miligrama
ml	mililitros
MS	matéria seca
MPE	mieloencefalite protozoária equina
NMI	neurónios motores inferiores
NMS	neurónios motores superiores
NRC	<i>National Research Council</i>
P	pulso
PD	pulso digital
PP	prega de pele
PV	peso vivo
PUFAs	ácidos gordos polinsaturados
Se	selénio
SNA	sistema nervoso autónomo
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
SOD	superóxido dismutase
T	temperatura
TDP-43	<i>Trans-Active Response DNA Binding Protein of 43 kDa</i>
TRC	tempo de repleção capilar
UAB	Universidade Autónoma de Barcelona
UI	unidades internacionais

VLDL	lipoproteínas de densidade muito baixa
Zn	zinco
α -TTP	proteína citosólica de transferência do α -tocoferol
μ g	micrograma
%	percentagem

ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO

O estágio curricular integrado no Mestrado Integrado de Medicina Veterinária foi realizado na área de clínica de equinos em dois regimes distintos. A primeira fase foi realizada em regime hospitalar na Unidade Equina do Hospital Clínico Veterinário da Universidade Autónoma de Barcelona, entre 1 de Outubro de 2012 e 21 de Dezembro de 2012, no âmbito do programa de mobilidade Erasmus. Posteriormente, teve início a segunda fase, a 2 de Janeiro de 2013, realizada na Equimuralha, em regime de ambulatório, que terminou a 31 de Junho de 2013.

A Unidade Equina do Hospital Clínico Veterinário da Universidade Autónoma de Barcelona (HCV-UAB) é uma referência na Catalunha, assistindo anualmente 400 a 500 equinos. No entanto, verificou-se uma quebra acentuada da casuística, tendo sido assistidos apenas cerca de 300 cavalos, em 2012. Segundo a equipa médico-veterinária do hospital, esta diminuição esteve relacionada com a crise que o país atravessa, à semelhança de Portugal. O HCV-UAB presta um serviço de 24h por dia, todos os dias da semana. Encontra-se dividido em 2 departamentos: medicina interna e cirurgia. Cada um integra um médico veterinário diplomado, médicos-veterinários associados, 2 médicos-veterinários residentes e 2 médicos-veterinários internos, estes últimos em regime de rotação a cada 2 semanas. Os estagiários normalmente não estão fixos em nenhum serviço, o que me permitiu colaborar em diversos procedimentos e acompanhar o maior número de casos possível. O serviço de medicina interna é responsável por consultas especializadas na área da neurologia, cardiologia, gastroenterologia, neonatologia, imunologia, endocrinologia, oncologia, medicina desportiva e medicina de urgência. Por outro lado, o serviço de cirurgia é responsável por todas as intervenções cirúrgicas e posteriores acompanhamentos dos pacientes, incluindo os exames com meios de diagnósticos complementares, como ecografia, endoscopia e radiologia. Diariamente são realizadas rondas clínicas, às 9 horas e às 18 horas, onde se junta toda a equipa para partilhar opiniões sobre os casos em acompanhamento. Uma vez que se trata de um hospital escolar, durante as rondas os clínicos procuram fornecer muita informação e discutir os casos de forma exaustiva, a fim de transmitir o máximo conhecimento aos estudantes, sendo bastante útil para os estagiários. Tive ainda a oportunidade de assistir às aulas de clínica de equinos lecionadas para os estudantes da Universidade Autónoma de Barcelona (UAB) e participar em atividades experimentais e apresentações de diversos temas, efetuadas pelos clínicos residentes e internos. Semanalmente são realizados dois “Journal Clubs”, um no âmbito da medicina interna, com supervisão do professor diplomado e dos residentes do departamento, e outro no âmbito da cirurgia, seguindo o mesmo esquema de funcionamento. Em cada sessão, artigos científicos são apresentados pelos médicos internos do respetivo serviço, sendo posteriormente discutidos em clima de mesa redonda. A escolha dos artigos é feita de acordo com o interesse de toda a equipa ou com

temas associados a doenças de animais que se encontram hospitalizados. Diariamente tive oportunidade de participar na preparação das salas para receber os pacientes urgentes, na realização da medicação diária, exame físico e tratamento de pacientes internados.

Durante o período de estágio todos os cavalos recebidos devido a problemas locomotores já tinham sido avaliados por veterinários de campo e mais de 50% (percentagem) tinha como objetivo realizar exame radiográfico da coluna vertebral. Ainda no âmbito das patologias locomotoras, assisti à realização de cintigrafias, exames radiológicos e diagnóstico e tratamento de claudicações. As cirurgias relacionadas com o aparelho locomotor foram todas com o intuito de eliminar exostoses ou fragmentos ósseos dentro de articulações, com recurso a artroscopia.

Nos casos em que os pacientes davam entrada na Unidade Equina em regime de urgência, como estagiário acompanhei todo o procedimento de receção dos pacientes, exame clínico, análises laboratoriais e intervenção cirúrgica, quando necessária. Ao longo do período de estágio, assisti a casos de oftalmologia, tendo um dos pacientes permanecido dois meses e meio internado na unidade. Este cavalo esteve sujeito a avaliações diárias e tratamento exaustivo por parte do departamento de oftalmologia, permitindo visualizar vários procedimentos menos frequentes no exercício da clínica de equinos.

A Equimuralha, onde foi realizada a segunda fase do estágio curricular, é uma empresa que presta serviços médico-veterinários em regime ambulatorio, exclusivamente a equinos. O funcionamento em parceria com o Hospital Muralha de Évora permite a partilha de recursos, nomeadamente administrativos e laboratoriais. Durante o estágio acompanhei dois médicos veterinários que exercem a sua atividade clínica na Equimuralha, Dra. Mónica Mira, orientadora desta dissertação, e Dr. Tomé Fino. Durante este período a casuística foi característica do regime de ambulatorio, abrangendo diversas áreas da clínica de equinos: medicina interna, afeções locomotoras e medicina desportiva, traumatologia, odontologia, neonatologia, reprodução, pequena cirurgia, profilaxia e identificação.

Visto que muitos pacientes observados se tratavam de cavalos de desporto, durante o estágio, as consultas de ortopedia foram bastante frequentes. No decorrer das mesmas tive oportunidade de acompanhar a realização de exames de claudicação estáticos e em movimento, bloqueios anestésicos e utilização de meios de diagnóstico complementares como a radiografia e a ecografia.

Ao longo das consultas de identificação e profilaxia foi-me solicitada colaboração na colocação de microchips, realização de resenhos, colheita de sangue para genótipo e administração de vacinas e desparasitação. As consultas de dentisteria também foram bastante frequentes, nestas assisti à grosagem dos dentes para correção de ganchos e pontas dentárias, a extrações de dentes de lobo, dentes pré-molares e dentes incisivos de leite e ainda a duas extrações de pré-molares definitivos, realizadas em conjunto com um colega espanhol.

No âmbito da reprodução efetuou-se o acompanhamento reprodutivo de éguas e diagnóstico de gestação. Na neonatologia ajudei na assistência a duas éguas em trabalho de parto e alguns poldros com falha de transferência passiva de imunidade.

Em diversas situações efetuou-se diagnóstico e resolução de casos de úlceras da córnea e feridas variadas de origem traumática. Durante o estágio pude ainda acompanhar casos de cólicas, devido a descolamentos do intestino e a impatações gástricas. A equimuralha à semelhança da UAB também organizava semanalmente um “Journal Club” com o objetivo de discutir artigos científicos. A escolha dos artigos está relacionada com a sua relevância clínica, sendo a sessão aberta a outros médicos veterinários da região e alunos da Universidade de Évora interessados na área.

Além de todas as atividades clínicas, associadas à prática de ambulatório, pude participar em várias provas de resistência equestre, onde os clínicos desempenhavam funções de médicos veterinários oficiais da Federação Equestre Internacional (FEI). Este trabalho foi bastante vantajoso para a minha formação, na medida em que me permitiu assistir aos exames veterinários próprios deste tipo de prova, visualizando muitos equinos que apresentavam claudicações de diferentes graus, melhorando assim a minha capacidade de identificação das mesmas.

INTRODUÇÃO

As doenças relacionadas com o sistema nervoso apresentam alguns sinais clínicos comuns entre si, mas também com outras patologias, como patologias locomotoras, o que dificulta o seu diagnóstico.

Após os primeiros casos de DNME terem sido identificados nos Estados Unidos, vários cavalos foram diagnosticados com esta doença, um pouco por todo o mundo (Furr & Reed, 2008). Aparentemente, existiam muitos casos subdiagnosticados ou mal diagnosticados, devido ao desconhecimento e falta de informação sobre a DNME (DeVilbiss, Mohammed, & Divers, 2009).

A maioria dos proprietários desconhece as necessidades nutricionais dos seus animais e a escolha do tipo e quantidade de alimento a utilizar no regime alimentar dos cavalos prende-se muitas vezes com conhecimento empírico e fatores económicos.

Em Portugal, ainda existe pouca preocupação em utilizar forragens de boa qualidade. Maioritariamente as atenções estão voltadas para os alimentos compostos (AC), os quais quase sempre são erradamente designados por “ração” entre criadores de cavalos e equitadores. Estes são uma temática bastante discutida, pois todos pretendem fornecer o AC ideal para suprimir eventuais carências alimentares do seu cavalo. A diversidade de marcas e gamas de AC para equinos, hoje em dia disponíveis no mercado, conduzem à incerteza no momento da escolha.

Havendo várias doenças associadas a desequilíbrios nutricionais, como a DNME, é fundamental sensibilizar todos aqueles que de alguma forma lidam com equinos, para a existência das mesmas e instruí-los de maneira a prevenirem a sua ocorrência e a efetuarem uma boa gestão dos recursos alimentares que têm a sua disposição.

Visto que em Portugal não existia nenhum relato referente a casos de DNME, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo retrospectivo de oito casos de DNME, identificados em cavalos sem acesso à pastagem sujeitos ao mesmo regime alimentar, no período de 2007-2009 em Portugal. Além disso, pretendeu-se fornecer uma noção geral da quantidade de vitamina E que pode ser disponibilizada a cavalos recorrendo a AC e alimentos compostos complementares (ACC) para equinos, existentes no mercado português.

Assim sendo, pretende-se que este estudo tenha um carácter informativo e que possa contribuir para sensibilizar médicos veterinários, criadores e equitadores para a existência da doença em Portugal e para a importância de um regime alimentar equilibrado que forneça vitamina E suficiente para combater a necessidade de cada equino.

I. SISTEMA NERVOSO

Existem três componentes principais do sistema nervoso: sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso autónomo (SNA) e o sistema nervoso periférico (SNP) (Furr & Reed, 2008; Thomson, 2012).

1. SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O SNC é constituído pelo cérebro e medula espinhal, estando protegido pelo crânio e pela coluna vertebral (Mayhew, 2009; Thomson, 2012).

Ambos são constituídos por substância cinzenta, onde se encontram os corpos celulares e processos desmielinizados dos neurónios, e por substância branca onde se localizam os feixes, as vias dendríticas (aferentes) e os processos axonais (eferentes) desses corpos celulares (Mayhew, 2009). A presença de cor branca ocorre devido ao complexo lipoproteico branco que envolve os neurónios, designado por mielina (Junqueira, Carneiro, Abrahamsohn, Zorn, & Santos, 2004).

A medula espinhal é dividida clinicamente em cinco regiões funcionais importantes: cervical, toracolombar, caudal, intumescência cervical e intumescência lombar (Thomson, 2012).

Funcionalmente, as divisões do cérebro são: proencéfalo, tronco cerebral e cerebelo e cada porção está associada a funções distintas (Thomson, 2012).

O SNC pode ser classificado de várias maneiras. Um esquema simples inclui o sistema sensitivo (aferente), sistema motor (eferente) e sistema autónomo (aferente e eferente) (Lorenz, 2004; Thomson, 2012).

No caso concreto do sistema motor ou eferente, este corresponde à porção do SNP que é classificada com base na localização das terminações nervosas dos neurónios motores, designadas por telodendritos. Este sistema é composto por duas divisões: neurónios motores inferiores (NMI), nas quais a porção final do neurónio inerva a célula muscular, e neurónios motores superiores (NMS), com uma componente somática e visceral. (DeLahunta & Glass, 2009).

2. SISTEMA NERVOSO AUTONOMO

O SNA tem características anatómicas comuns ao SNC assim como ao SNP (Furr & Reed, 2008), uma vez que inclui componentes centrais e periféricos, estes últimos encontrados nos nervos cranianos e espinhais. Consiste em fibras eferentes que inervam o músculo liso, o músculo cardíaco e os órgãos (Thomson, 2012).

As funções do SNA são manter a homeostasia do organismo em repouso e durante o stress. Funcionalmente é dividido em dois sistemas, normalmente antagonistas: sistema nervoso simpático e sistema nervoso parassimpático. O sistema nervoso simpático prepara o corpo

para a atividade por aumento da frequência respiratória (FR) e da frequência cardíaca (FC), dilatação das pupilas, redirecionamento do fluxo sanguíneo maioritariamente para os músculos dos membros. O sistema parassimpático controla as atividades diárias como a digestão e a eliminação de resíduos. (Furr & Reed, 2008; Thomson, 2012).

3. SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO

Os SNP consiste nos nervos e gânglios localizados fora do cérebro e da medula espinhal, os quais são responsáveis pela ligação do SNC à cabeça, corpo, membros e órgãos (Mayhew, 2009).

Os processos neuronais do SNP são designados por fibras nervosas e formam as raízes nervosas, os plexos nervosos e os nervos periféricos, os quais são mielinizados por células de Schwann que permitem a condução dos impulsos elétricos de forma mais rápida (Mayhew, 2009). As células de Schwann formam as bainhas de mielina isoladoras dos axónios periféricos, ao passo que no SNC, esta tarefa é realizada por oligodendrócitos (Junqueira et al., 2004). Ao contrário do SNC, o SNP não está protegido por tecido ósseo, o que o torna mais vulnerável a lesões mecânicas (Thomson, 2012).

Várias redes de nervos entrelaçados (plexos) ocorrem no SNP, a maioria correspondendo ao plexo braquial ao nível dos membros torácicos e ao plexo lombosagrado ao nível dos membros pélvicos (Mayhew, 2009).

4. MEDULA ESPINHAL

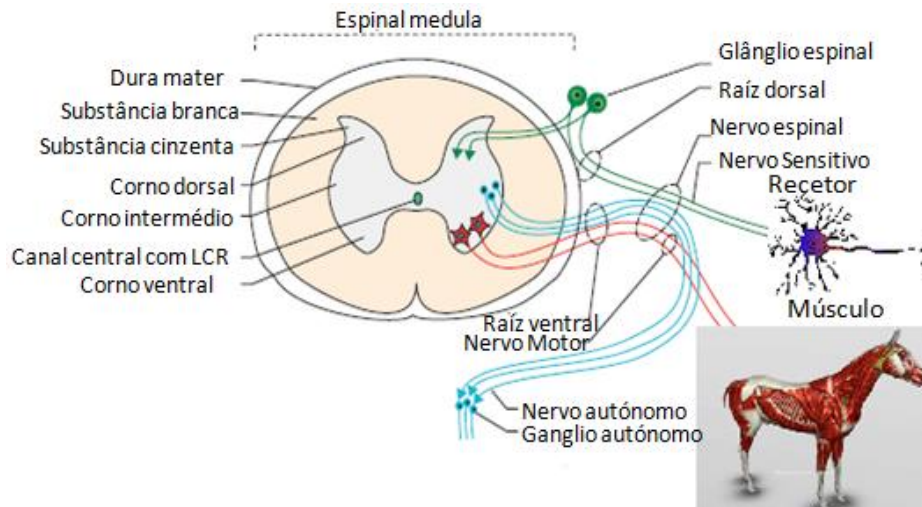
A medula espinhal é o elo de ligação entre o cérebro e os nervos espinhais periféricos e as estruturas por eles enervadas (Mayhew, 2009).

Anatomicamente está dividida em substância branca, localizada perifericamente, e substância cinzenta na região central (Furr & Reed, 2008) em forma de borboleta (Figura 1.) onde estão localizados os corpos celulares (Thomson, 2012). A substância cinzenta está dividida funcionalmente em regiões designadas por cornos que são colunas contínuas de células nervosas ao longo da medula espinhal (Furr & Reed, 2008).

As intumescências cervical e lombar são áreas da substância cinzenta da medula espinhal de diâmetro aumentado, onde os cornos dorsal e ventral são maiores e as raízes dos nervos são mais proeminentes, devido à acumulação de corpos celulares (Furr & Reed, 2008).

A substância branca está dividida anatomicamente em regiões designadas por cordões (ventral, lateral e dorsal). Os feixes são um conjunto específico de axónios no SNC que se prolongam através dos dendritos para sinapses e são designados normalmente de acordo com a sua origem e terminação. (Furr & Reed, 2008).

Figura 1. Secção transversal da medula espinhal torácica, ilustrando os nervos espinhais e seus componentes (Adaptado de Thomson, 2012).



5. TRONCO CEREBRAL

O tronco cerebral é composto pelo mesencéfalo, ponte e medula oblongata, e assegura a ligação entre a medula e os hemisférios cerebrais. (Furr & Reed, 2008; Thomson, 2012).

A substância cinzenta do tronco cerebral está disposta longitudinalmente mas as colunas tornam-se fragmentadas para formar aglomerados de corpos celulares com a mesma função. Estes aglomerados são designados por núcleos e muitos deles recebem ou emitem fibras nervosas que incorporam os nervos cranianos (Thomson, 2012).

Os glânglios constituem aglomerados de corpos celulares de nervos, com funções similares, localizados no exterior do SNC associados à raiz dorsal dos nervos periféricos, enquanto os núcleos são aglomerados de corpos celulares de nervos com função semelhante, dentro do SNC (Thomson, 2012). Estes últimos podem ser núcleos motores ou núcleos sensitivos (Monkhouse, 2006).

6. NERVOS PERIFÉRICOS

Os nervos periféricos transmitem informação sensorial e motora. Os impulsos sensoriais têm origem em numerosos recetores nervosos na periferia e são transmitidos ao SNC, ao passo que os impulsos motores são originados no SNC e viajam através dos nervos periféricos, de forma a fornecer inervação somática e visceral às estruturas do organismo (Furr & Reed, 2008).

As duas grandes categorias de nervos periféricos são: nervos espinhais e nervos cranianos. A distinção entre nervos espinhais e nervos cranianos é realizada com base na localização

anatômica. Os nervos espinhais estão ligados à medula, enquanto que os nervos cranianos estão localizados no crânio, ligados ao tronco cerebral (Furr & Reed, 2008).

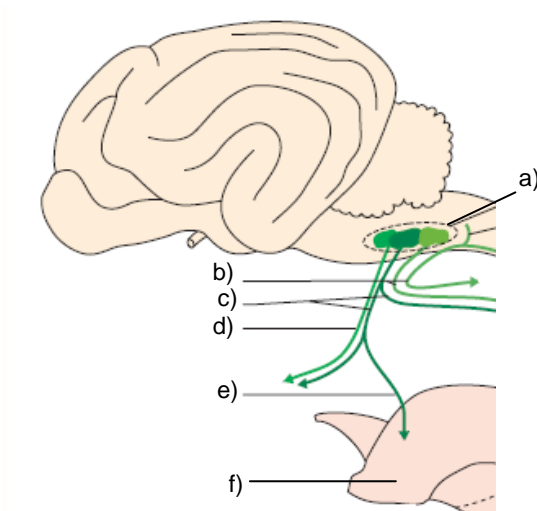
6.1. Nervos Cranianos

Os nervos cranianos surgem a partir do cérebro como doze pares que são numerados de I a XII no sentido rostrocaudal. Estes desempenham funções sensitivas, motoras ou ambas em função do tipo de fibras nervosa que constitui cada nervo. (Monkhouse, 2006).

O núcleo ambíguo é composto por uma coluna de corpos celulares organizados ventrolateralmente à medula oblongata (Thomson, 2012). Apresenta fibras eferentes dos nervos cranianos glossofaríngeo (IX), vago (X) e acessório (XI) (Figura 2.) que inervam os músculos estriados da faringe, laringe e esôfago (DeLahunta & Glass, 2009; Thomson, 2012).

Lesões na porção caudal do núcleo ambíguo, nos axônios somáticos eferentes do ramo interno do nervo acessório, na porção cervical do nervo vago ou no seu ramo laríngeo, na porção caudal do nervo laríngeo ou músculos da laringe resultam em paralisia laríngea. Por outro lado, lesões que se situem nos dois terços rostrais do núcleo ambíguo, nos axônios somáticos eferentes dos nervos vago e glossofaríngeo ou nos músculos da faringe ou esôfago resultam em disfagia de vários graus. (DeLahunta & Glass, 2009).

Figura 2. Representação dos nervos cranianos originados no núcleo ambíguos, responsáveis pela enervação da laringe, faringe e esôfago (Adaptado de Thomson, 2012).



Legenda. Observa-se em a) núcleo ambíguos; b) nervo acessório (XI); c) nervo vago (X) ; d) nervo glossofaríngeo; e) nervo laríngeo cranial; f) laringe.

6.2. Nervos Espinhais

As raízes dorsais emitidas pelo corno dorsal da substância cinzenta da medula espinhal transportam fibras nervosas sensoriais com um gânglio espinhal composto pelos seus

corpos celulares. As raízes ventrais têm origem no corno ventral da substância cinzenta da medula espinhal e transportam fibras nervosas motoras, as quais podem ser somáticas e inervar o músculo estriado, ou autónomas e inervar o músculo liso ou cardíaco. As raízes dorsais e as raízes ventrais fundem-se ao nível do forâmen intervertebral dando origem ao nervo espinhal responsável pela inervação periférica (Lorenz, 2004; Furr & Reed, 2008; Thomson, 2012).

7. NEURÓNIO

Os neurónios são os principais componentes do cérebro, medula espinhal e nervos dos vertebrados. Os neurónios são células excitáveis que recebem e integram informação recebida a partir de recetores sensoriais e de outros neurónios, transmitindo posteriormente essa informação a outros neurónios ou órgãos efetores (Thomson, 2012).

Os neurónios são compostos por: zona dendrítica, axónio, corpo celular e telodendritos. A zona dendrítica corresponde à porção recetora, onde estímulos ambientais internos ou externos são convertidos num impulso. O axónio é o processo da célula composto por neurofilamentos, os quais se estendem desde a zona dendrítica até zona dos telodendritos, que corresponde à porção terminal onde o impulso deixa o neurónio (DeLahunta & Glass, 2009). O corpo celular é a parte do neurónio que contém o núcleo e o citoplasma envolvente, tem função recetora e integradora de estímulos, recebendo estímulos excitatórios ou inibitórios por parte de outras células nervosas (Junqueira et al., 2004).

7.1. Neurónios Motores Inferiores

Os neurónios motores podem ser classificados em NMS e NMI. (DeLahunta & Glass, 2009; Thomson, 2012). No caso do NMI, o corpo celular localiza-se no SNC nos cornos ventrais e intermédios da substância cinzenta da medula espinhal e nos núcleos dos nervos cranianos (nervo craniano III-VII, IX-XII) do tronco cerebral. O percurso dos axónios faz-se através da substância branca entre o cordão lateral e ventral saindo da medula espinhal como uma pequena raiz que se continua pelo nervo espinhal e viaja até aos membros de forma a enervar grupos específicos de fibras musculares. O axónio estabelece sinapses ao nível das junções neuromusculares, inervando o músculo estriado, liso e cardíaco. A junção neuromuscular consiste no terminal distendido do axónio, coberto por uma célula de Schwann que não formou mielina, até ao ponto onde o axónio se estende pelo sarcoplasma através da superfície da célula muscular (DeLahunta & Glass, 2009).

A forma e o tamanho da substância cinzenta reflete o número de neurónios presente, o qual é determinado pelo volume de músculo estriado que é enervado (Lorenz, 2004; Thomson, 2012).

No caso dos NMI, o neurotransmissor que assegura a ligação entre o nervo motor e o músculo estriado é a acetilcolina (Ach) (DeLahunta & Glass, 2009; Thomson, 2012).

7.1.1 Sinais clínicos de lesões do Neurónio Motor Inferior

Alterações nos NMI provocam alteração da função motora caracterizada por paresia ou paralisia, atrofia muscular e atrofia neurogénica. Os reflexos também são alterados existindo hiporeflexia ou arreflexia. O normal tónus muscular depende da regulação constante efetuada pelos NMI que inervam o músculo estriado e em casos de doença do NMI o tónus diminui verificando-se hipotonia ou mesmo atonia (Lorenz, 2004; Thomson, 2012).

Em lesões dos NMI normalmente verifica-se a presença de paresia que corresponde à perda parcial de motricidade que se pode caracterizar por dificuldade em andar ou em suportar o peso. O termo paralisia só deve ser utilizado quando há ausência de qualquer movimento voluntário. (DeLahunta & Glass, 2009).

A degenerescência muscular ocorre quando os NMI que enervam determinado grupo de fibras muscular estão disfuncionais. A perda de impulsos axonais resulta na degenerescência rápida do músculo enervado que é referida como degenerescência ou atrofia neurogénica. Caracteriza-se por ser rápida e grave podendo ser observada pela primeira vez num grupo de músculos cerca de 7 dias após a deservação (DeLahunta & Glass, 2009), momento em que também surgem as primeiras alterações no exame eletromiográfico (fibrilhação, ondas agudas positivas) (Lorenz, 2004).

A perda de qualquer componente do NMI resulta em atrofia muscular por deservação. Estes componentes incluem o corpo celular da substância cinzenta, as raízes ventrais e os nervos da medula ou qualquer parte de um nervo periférico no seu percurso até ao músculo (DeLahunta & Glass, 2009).

8. DEGENERESCÊNCIA WALLERIANA

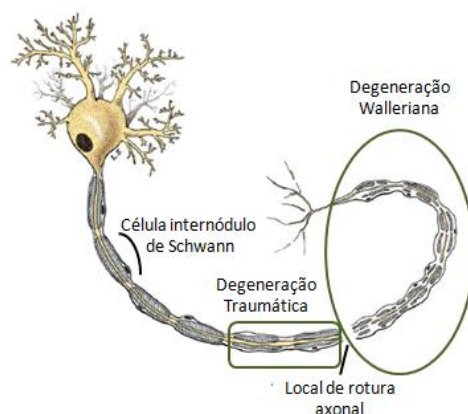
A degenerescência Walleriana (Figura 3.) é uma degenerescência trófica que ocorre no neurónio no local da lesão e estende-se em direção distal a partir do corpo celular (Junqueira et al., 2004).

A degenerescência axonal caracteriza-se um processo de edema e subsequentemente granulação que pode levar cerca de 3 a 4 dias (Junqueira et al., 2004; DeLahunta & Glass, 2009). A mielina só sobrevive na presença de um axónio saudável, pelo que a degenerescência da mielina ocorre simultaneamente com a degenerescência do axónio. As células de Schwann são reduzidas e os seus núcleos e organelos citoplasmáticos rapidamente proliferam para formar uma coluna de células conhecida com banda de

Büngner. Estas colunas providenciam vias para regeneração dos axónios que foram degenerados e fornecem fatores de crescimento que induzem crescimento de gomos axonais a partir da porção proximal do neurónio que se encontra intacta (DeLahunta & Glass, 2009). Esta regeneração começa em cerca de 7 dias e a taxa de crescimento é à volta de 1 a 4 mm por dia (Junqueira et al., 2004).

A reação axonal corresponde ao termo utilizado para designar a reação que ocorre no corpo celular na medula espinhal, em que existe ligeiro edema do corpo celular, deslocamento do núcleo (núcleo excêntrico) e perda de retículo endoplasmático granular da substância de Nissl dentro do citoplasma. Este último caso é referido como cromatólise central, a qual representa o esforço do corpo celular em gerar mais produtos para o fluxo de axoplasma necessário no processo de regeneração (DeLahunta & Glass, 2009).

Figura 3. Degenerescência Walleriana de um neurónio motor inferior (Adaptado de DeLahunta & Glass, 2009).



9. EXAME NEUROLÓGICO

O exame neurológico consiste na recolha de informações sobre a sintomatologia e a história clínica do paciente e num exame físico completo. Se possível também devem ser recolhidas informações acerca do meio ambiente, pois estas podem fornecer indicações bastante úteis no momento do diagnóstico (Mayhew, 2009).

A finalidade do exame neurológico é determinar alterações neurológicas e com base nestas, identificar lesões e a sua localização. A realização de um exame sistematizado, no qual os procedimentos são efectuados segundo uma rotina constante, permite ao clínico realizar um exame de forma mais confiante e diminui o risco de falhas ou esquecimento de algum procedimento (Furr & Reed, 2008). Durante a avaliação neurológica podem ser considerados cinco componentes: movimento de caminhar e postura, reações posturais, nervos espinhais, nervos cranianos e sensibilidade (DeLahunta & Glass, 2009).

Particularmente em cavalos, avalia-se a resposta de adução da laringe, os movimentos de caminhada a passo e trote com mudanças de direção rápidas. A inspeção e palpação da massa muscular, bem como da integridade óssea e a identificação de manchas de sudação no corpo ou membros, também devem fazer parte deste exame. Enquanto é medida a temperatura no recto, pode-se avaliar o tónus do ânus e os reflexos da cauda (Mayhew, 2009).

Este tipo de exame permite ao médico veterinário decidir se deve efectuar um exame neurológico mais detalhado. Por vezes, os sinais identificados são bastante indicativos e suficientes para desenvolver um plano inicial de diagnóstico diferencial (Mayhew, 2009). A utilização de procedimentos auxiliares vai depender do diagnóstico diferencial considerado inicialmente (DeLahunta & Glass, 2009).

II. VITAMINA E

As vitaminas são nutrientes que os cavalos exigem em quantidades muito pequenas, no entanto verifica-se uma elevada variação destas quantidades consoante o tipo de vitamina. Para as funções corporais normais, os cavalos utilizam vitaminas presentes na alimentação, em suplementos adicionais ou que são sintetizadas pelos tecidos (Frape, 2004; Pagan, 2009).

A vitamina E, tal como a vitamina A, não é sintetizada pelo organismo dos equinos, portanto a ingestão deste elemento essencial está dependente das práticas de manejo alimentar e nos ingredientes utilizados na formulação das dietas (Frape, 2004; Pagan, 2009).

1. ESTRUTURA QUÍMICA E PROPRIEDADES

A Vitamina E é o termo genérico utilizado para designar a atividade de um dos 8 compostos pertencentes a 2 subgrupos: tocoferóis e tocotrienóis, que são compostos por quatro isoformas individuais (α , β , γ , δ) (Finno & Valberg, 2012). Ambos consistem num anel de cromanol com uma cadeia lateral de 16-C, sendo que os tocoferóis têm uma cadeia lateral saturada, enquanto os tocotrienóis contêm uma cadeia lateral não-saturada. As isoformas individuais diferem na localização e no número de grupos metil no anel de cromanol, contribuindo para algumas diferenças na atividade da vitamina E que estas apresentam (National Research Council [NRC] (U.S.), 2007).

O α -tocoferol existe na natureza, como estereoisómeros 2'R, 4'R, 8'R, uma vez que têm a configuração -R em três posições diferentes no anel de cromanol, sendo comumente designado por RRR- α -tocoferol (NRC, 2007). Assim a vitamina E natural é composta apenas por um isómero (RRR- α -tocoferol ou d- α -tocoferol), enquanto a vitamina E sintética é composta por uma mistura de oito isómeros (all-rac- α -tocoferol ou dl- α -tocoferol), em que apenas um (12,5%) é idêntico ao isómero natural (Pagan, Kane, & Nash, 2005; Fiorellino, Lamprecht, & Williams, 2009).

A vitamina E natural (RRR- α -tocoferol) é biologicamente mais ativa e com propriedades antioxidantes mais potentes, pois esta é facilmente captada pelo fígado e subsequentemente libertada no plasma para transporte até aos tecidos periféricos (Pagan, 2009; Finno & Valberg, 2012).

2. STRESS OXIDATIVO

O *stress* oxidativo é causado por um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigénio (EROs) produzido durante a respiração celular e o sistema antioxidante do organismo utilizado para eliminar estas EROs (Williams & Burk, 2012). A indução do *stress* oxidativo

também pode depender de fatores como a dieta desequilibrada, a duração e intensidade do exercício e a presença de uma doença pré-existente (Deaton & Marlin, 2005).

As EROs são oxidantes que podem ser definidos como moléculas que contêm oxigénio e são mais reativas do que as moléculas de oxigénio presentes no ar. Estas incluem os radicais livres que são moléculas ou fragmentos de moléculas com um ou mais eletrões de valência desemparelhados do átomo ou da órbita molecular, o que leva ao aumento considerável da reatividade (Kirschvink, Moffarts, & Lekeux, 2008). Os radicais livres são normalmente produzidos como parte normal do metabolismo celular, mas podem tornar-se excessivos após uma lesão/agressão ou doença. As EROs têm a capacidade de destruir a estrutura das membranas celulares e alterar ácidos gordos polinsaturados, proteínas e DNA (Pagan, 2009).

Nos equinos o *stress* oxidativo está envolvido em diversas doenças, como obstrução recorrente das vias aéreas, osteoartrite, doença do neurónio motor, mieloencefalopatia degenerativa equina (MDE), doença do músculo branco, laminite, disfunção da parte intermédia da pituitária, endometrite e efeitos negativos associados ao exercício intenso e prolongado (Wong, Moore, & Brockus, 2012).

O organismo está bem equipado para lidar com a produção de EROs com “sistemas de limpeza” de antioxidantes endógenos, que incluem antioxidantes enzimáticos, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase e peroxidase glutathione (GPx). Além disso, há inúmeros antioxidantes não-enzimáticos, tais como α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico, ceruloplasmina, transferrina, albumina, glutathione, ácido úrico e entre outras (Soffler, 2007). Ou seja, os antioxidantes podem ser vitaminas, minerais e/ou enzimas, sintetizados pelo corpo ou obtidos a partir da dieta (Williams & Burk, 2012). Os mecanismos de defesa contra os oxidantes, implicam sistemas que impedem a formação de EROs, sistemas antioxidantes que inativam oxidantes e sistemas capazes de reduzir os seus efeitos nocivos permitindo reparação de danos oxidativos (Kirschvink et al., 2008).

Todas as vitaminas antioxidantes são suscetíveis de oxidação, durante a produção ou armazenamento prolongado, e têm um tempo de semivida limitado. Consequentemente, a qualidade e eficiência de suplementos comercializados pode variar consideravelmente, sendo recomendada uma seleção cuidadosa. A biodisponibilidade de oligoelementos também pode variar na presença de outros minerais e microelementos (Kirschvink et al., 2008).

Embora as concentrações de vitaminas ou oligoelementos fornecidos através da suplementação possam ser detetadas rapidamente no sangue, o efeito benéfico no equilíbrio oxidante/antioxidante ocorre apenas algumas semanas após o início da sua administração (Kirschvink et al., 2008).

No caso de equinos sujeitos a exercício intenso e prolongado ou portadores de processos inflamatórios crónicos, verifica-se um aumento de moléculas oxidantes e modificação do

equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes originando danos moleculares. Estes cavalos apresentam uma maior necessidade de antioxidantes, que conduz os proprietários e equitadores a recorrerem rotineiramente à suplementação com antioxidantes, apesar de frequentemente existir falta de informação acerca da dose ótima para induzir efeitos benéficos (Kirschvink et al., 2008; Rey, Segura, Arandilla, & Lopez-Bote, 2013).

A vitamina E tem sido um dos compostos mais estudados pelo papel importante que desempenha na captura de radicais livres e outras substâncias reativas (Rey et al., 2013).

3. PAPEL DA VITAMINA E

A vitamina E corresponde ao maior antioxidante lipossolúvel, responsável pela proteção da integridade da membrana celular (Siciliano, Parker, & Lawrence, 1997).

A possibilidade de oxidação por parte dos ácidos gordos contidos nas células do sistema imunitário conduz a um maior risco lesão oxidativa deste sistema. Em muitas espécies animais, há evidência que a suplementação com vitamina E pode melhorar a função imunitária em animais imunocomprometidos e reparar algumas alterações relacionadas com a idade (Petersson, Burr, Gomez-Chiarri, & Petersson-Wolfe, 2010; Finno & Valberg, 2012).

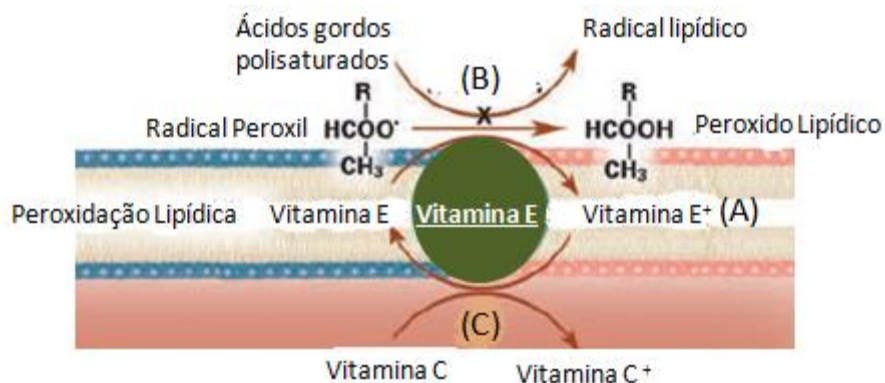
Num estudo, em que se pesquisou o papel do α -tocoferol na resposta humoral pela vacinação contra a toxina do tétano e o vírus da influenza equina, os cavalos pertencentes à amostra foram suplementados com acetato all-rac- α -tocoferol (15 unidades internacionais (UI) / quilograma (Kg) de peso vivo (PV)), durante 16 semanas. Nos equinos suplementados verificou-se um aumento da capacidade bactericida dos neutrófilos e monócitos e um aumento da produção de imunoglobulinas IgG_a e IgG_T. Estes resultados levaram os autores a concluir que a suplementação com vitamina E pode ser uma maneira pouco dispendiosa e benéfica de melhorar a resposta imunitária em cavalos mais velhos, promovendo proteção contra doenças e infeções (Petersson et al., 2010).

Apesar de ainda não ser claro que a suplementação com vitamina E melhor a função reprodutiva dos equinos, sabe-se que as EROs afetam múltiplos processos reprodutivos, como a função normal dos espermatozóides, o desenvolvimento embrionário e a gravidez (Finno & Valberg, 2012).

A maior evidência relacionada com a alteração dos níveis de vitamina E no organismo, verifica-se no sistema neuromuscular. Os primeiros trabalhos experimentais desenvolvidos em ratos, revelaram que ataxia e disfunção muscular podiam resultar de dietas pobres em vitamina E. Durante estes trabalhos, com recurso a estudos eletrofisiológicos, os investigadores verificaram que em ratos com carência de vitamina E a degenerescência muscular precedia a degenerescência dos nervos periféricos (Finno & Valberg, 2012).

Os mecanismos moleculares e celulares que conduzem à disfunção neuromuscular após carência de α -tocoferol ainda não estão bem definidos, no entanto a implicação da

deficiência de vitamina E na patogénese da DNM, sugere que a lesão oxidativa desempenha um papel fundamental neste tipo de doença (Finno & Valberg, 2012).



4. ABSORÇÃO, METABOLISMO E EXCREÇÃO

A absorção passiva de vitamina E natural pelos enterócitos é considerada a maior via de absorção, contudo pode também haver envolvimento de um recetor ("scavenger- receptor class B type I – SR-BI") que é muito importante no transporte e absorção pelos tecidos. A absorção e metabolismo de gordura pode influenciar a absorção e transporte de vitamina E. Assim a ausência de gordura na dieta pode conduzir à diminuição da absorção de vitamina E (Finno & Valberg, 2012).

libertados na linfa (Williams & Carlucci, 2006) ou em último caso na corrente sanguínea (Finno & Valberg, 2012).

Na linfa as lipases das lipoproteínas (LLP) quebram os quilomicrons e são removidos alguns tocoferóis, os restantes quilomicrons são transferidos continuam o seu percurso, primeiro na linfa, depois na circulação sanguínea até atingirem o fígado (Williams & Carlucci, 2006).

O fígado recupera os quilomicrons por endocitose. A proteína citosólica de transferência do α -tocoferol (α -TTP) liga-se seletivamente ao RRR- α -tocoferol, colocando-o em lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Esta ligação seletiva origina o aumento do tempo de semi-vida do RRR- α -tocoferol (cerca de 3 vezes mais) quando comparado com outros estereoisómeros (Williams & Carlucci, 2006; Finno & Valberg, 2012).

Nos tecidos periféricos são utilizados vários recetores na absorção celular de RRR- α -tocoferol, (Finno & Valberg, 2012). Há tecidos que se caracterizam por uma absorção mais rápida, como o baço, o fígado, o plasma e os eritrócitos, e tecidos onde a absorção é mais lenta, como o coração, os testículos, o músculo, o cérebro e a medula espinhal (Williams & Carlucci, 2006).

As grandes reservas corporais de vitamina E incluem o tecido adiposo, o fígado e o tecido muscular, no entanto o tecido adiposo por si só representa 90% dessas reservas. Cada isoforma (α , β , γ , δ) produz um metabolito específico, o qual antes de ser excretado na bÍlis ou urina sofre conjugação enzimática. O próprio α -tocoferol pode ser excretado na bÍlis através de um sistema (sistema citocromo P450 – CYP) comum a outros fármacos. Esta situação pode causar efeitos adversos, como intoxicações, devido ao aumento da biodisponibilidade de alguns fármacos, que sofram o mesmo modo de excreção, quando animais ou humanos são suplementados com doses elevadas de α -tocoferol (Finno & Valberg, 2012).

4.1. Absorção pela Barreira Hematoencefálica (BHE)

O papel da vitamina E, como antioxidante na estabilização das membranas biológicas está bem estabelecido. No entanto existe pouca informação sobre os possíveis efeitos de dietas pobres em vitamina E na integridade e função da BHE, responsável principal pela composição do líquido cefalorraquidiano (LCR) (Mohammed et al., 2008).

Têm sido desenvolvidos modelos experimentais com o objetivo de esclarecer a absorção da vitamina E através da barreira hematoencefálica. Num estudo em que um grupo de cavalos foi suplementado com 10.000 UI de d- α -tocoferol não acetato/dia, por via oral, verificou-se um aumento de 1,3 a 3,4 vezes da concentração de α -tocoferol no LCR ao fim de 10 dias de tratamento, em 9 dos 10 equinos presentes no estudo. Provou-se assim que o d- α -tocoferol não acetato é capaz de atravessar a BHE em equinos (Higgins, Puschner, Kass, & Pusterla, 2008). Vários transportadores estão envolvidos na absorção de α -tocoferol através

da BHE e em nenhum destes parece haver preferência para uma isoforma específica de vitamina E (Pusterla et al., 2010; Finno & Valberg, 2012).

Como a vitamina E é lipossolúvel, a percentagem individual de gordura corporal pode favorecer a absorção desta vitamina no tecido adiposo, diminuindo assim a quantidade acumulada no LCR e noutros tecidos (Higgins et al., 2008).

5. INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA AS CONCENTRAÇÕES DE α -TOCOFEROL NO PLASMA E SORO DE EQUINOS

Os intervalos sugeridos para a concentração de α -tocoferol no plasma e soro dos equinos, consideram que valores acima de 2 microgramas (μg) por mililitro (ml) de α -tocoferol serão adequados e abaixo de 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de α -tocoferol são inadequados ou insuficientes. Os animais com concentrações entre os valores acima indicados, são considerados como tendo uma concentração de α -tocoferol marginal (NRC, 2007).

Diversos autores sugerem diferentes intervalos de referência para as concentrações de α -tocoferol no soro e plasma dos equinos. Alguns só consideram adequadas concentrações superiores a 3 ou 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, no entanto isso levaria a considerar a maioria dos cavalos saudáveis carente em vitamina E (Higgins et al., 2008; Pagan, 2009; Finno & Valberg, 2012).

Verificou-se existir uma correlação linear entre a concentração de α -tocoferol no plasma e em outros tecidos, no entanto, a facilidade na obtenção de amostras sanguíneas quando comparadas com a recolha de amostras de tecido, tem conduzido a maioria dos veterinários a utilizarem a concentração plasmática para estimar os níveis de α -tocoferol (Finno & Valberg, 2012).

Quando se efetua o doseamento dos níveis de α -tocoferol num equino é extremamente importante considerar os diversos fatores que podem influenciar os resultados obtidos. Estes incluem: raça, idade, número de amostras, dieta, tempo que decorre entre a alimentação e a amostragem, condição física, método de colheita e armazenamento da amostra antes da análise (De la Rúa-Domènech et al., 1997; Finno & Valberg, 2012).

Cavalos de raça puro-sangue inglês apresentaram valores inferiores às restantes raças, independentemente do género (Frape, 2004). Poldros com menos de um ano apresentaram concentrações de α -tocoferol no plasma significativamente mais reduzidas face a cavalos com mais de um ano de idade, no entanto não se tem conseguido encontrar uma correlação entre as concentrações de α -tocoferol nas éguas e nos respetivos poldros neonatos (Finno & Valberg, 2012).

Tal como identificado em casos de DNME, verifica-se uma redução dos níveis de α -tocoferol nos meses com menor disponibilidade de pastagem (Mcgorum et al., 2006; Finno & Valberg,

2012). Foi ainda relatado que cavalos que pastavam erva fresca apresentavam uma concentração de vitamina E 63% superior aos cavalos que eram alimentados com erva previamente cortada e armazenada (De la Rúa-Domènech et al., 1997).

Verifica-se elevada variação individual na concentração de α -tocoferol no soro, num curto período (horas), a qual pode estar relacionada com a alimentação e com flutuações circadianas. Como tal é aconselhável realizar amostras múltiplas quando se pretende determinar com exatidão o nível de α -tocoferol de um determinado animal. No entanto, caso o objetivo seja apenas efetuar um controlo rotineiro, uma única amostra com valores considerados adequados, pode ser útil (Finno & Valberg, 2012).

A exposição à luz, o contacto com a borracha do tubo de recolha, a hemólise (redução média de 33%) (Finno & Valberg, 2012) ou o calor, podem reduzir o nível de α -tocoferol de uma amostra de plasma ou soro, logo após a colheita. Como tal, as amostras devem ser protegidas da luz e refrigeradas logo após a colheita (Higgins et al., 2008).

A condição física e o nível de esforço a que um cavalo está sujeito é outro fator que pode influenciar os resultados, pois é sabido que animais sujeitos a esforços intensos apresentam um maior consumo de α -tocoferol (Duberstein, Johnson, McDowell, & Ott, 2009; Williams & Burk, 2012).

6. CARÊNCIA DE VITAMINA E – DOENÇAS ASSOCIADAS

Para além da DNME, 2 doenças específicas têm sido constantemente associadas à carência de α -tocoferol: a MDE e Miopatia por Carência de Vitamina E (Finno & Valberg, 2012).

6.1. Mieloencefalopatia Degenerativa Equina

A fisiopatologia da MDE, tal como para a DNME, não está completamente compreendida (Reed, Bayly, & Sellon, 2010). Tem sido evidente a presença de uma componente genética. Pensa-se que seja autossómica recessiva e que esteja associada a mutações do gene que codifica a proteína transportadora de α -tocoferol. É comum os poldros afetados apresentarem níveis de α -tocoferol sorológicos baixos, no entanto não é consistente em todos os casos (Furr & Reed, 2008; Finno et al., 2011).

Esta doença caracteriza-se por degenerescência difusa das fibras nervosas da substância branca na porção caudal do tronco cerebral e, especialmente, na medula espinhal (Reed et al., 2010).

A distrofia neuroaxonal (DNA) é clinicamente indistinguível da MDE. Esta é considerada a base subjacente da MDE com probabilidade elevada da fisiopatologia de ambas ser semelhante (Finno & Valberg, 2012).

Nos primeiros casos reportados, a doença foi classificada com DNA, quando as lesões estavam confinadas ao feixe cuneano lateral (acessório), cuneano medial e núcleo grácil, enquanto a designação de MDE foi utilizada para casos de necrose axonal e desmielinização extensa no feixe espinocerebeleso dorsal e ventral e cordão ventromedial na medula espinhal cervico-torácica. Lesões consistentes com as duas doenças podem ser comuns no mesmo animal (Finno & Valberg, 2012).

O início dos sinais clínicos da MDE ocorre tipicamente entre o nascimento e os 36 meses de vida, embora a maioria dos casos se verifique entre os 6 e os 12 meses de idade. Não se verifica predisposição para um determinado género e já foram reportados casos em diversas raças, nomeadamente no cavalo lusitano (Finno et al., 2011; Finno & Valberg, 2012). A apresentação clínica mais comum ocorre em poldros com menos de um ano de idade com ataxia simétrica e paresia mais pronunciada dos membros pélvicos. (Secombe & Lester, 2012).

O diagnóstico *antemorten* para DNA/MDE é baseado apenas nos sinais clínicos, na exclusão de outras possíveis causas de alterações neurológicas e na baixa concentração sérica de α -tocoferol. O diagnóstico definitivo apenas é obtido com a avaliação histopatológica de amostras da medula espinhal e tronco cerebral, semelhante ao que se verifica na DNME (Finno & Valberg, 2012).

Em famílias com predisposição genética, casos de animais afetados anteriormente e pouco acesso a pastagem verde, a suplementação profilática com vitamina E está aconselhada. Pode reduzir os sintomas nos poldros que irão nascer embora não previna completamente o desenvolvimento da doença (Furr & Reed, 2008; Finno & Valberg, 2012; Secombe & Lester, 2012).

6.2. Miopatia Por Carência de Vitamina E

Um estudo recente sugere que alguns casos com características compatíveis com DNME que não são diagnosticados, se tratam de cavalos afetados por uma miopatia específica causada pela carência de vitamina E (Finno & Valberg, 2012; Bedford et al., 2013).

Bedford et al. (2013) avaliou 8 cavalos com atrofia muscular grave, aguda ou crónica, responsiva ao tratamento com vitamina E e 14 cavalos clinicamente normais (grupo controlo) que apresentavam concentrações musculares de α -tocoferol normais ou abaixo dos intervalos de referência. Histologicamente verificou-se uma redistribuição da coloração mitocondrial (aparência de “comido pela traça”) e atrofia angular das miofibrilas no músculo sacrococcígeo dorsal medial.

Os autores sugeriram que muitos dos casos não diagnosticados como DNME, podem resultar de miopatia por carência de vitamina E, apenas identificada por coloração mitocondrial do músculo sacrococcígeo dorsal medial congelado. Contudo, a maioria das amostras de tecido muscular são fixadas em formol, o que impede a execução deste tipo de coloração (Bedford et al., 2013).

A carência de vitamina E pode provocar danos nas membranas mitocondriais como resultado da capacidade oxidativa estar alterada, padrões de coloração mitocondriais anormais nas amostras de biópsias musculares e sinais de fraqueza muscular. Desta forma, foi sugerido que a miopatia devido à carência de vitamina E pode ser um síndrome específico ou, eventualmente, preceder o desenvolvimento de atrofia muscular neurogénica típica de DNME. Esta diferença não foi avaliada no estudo realizado, porque todos os cavalos recuperaram a força e a massa muscular nos 3 meses seguintes ao tratamento com vitamina E e a mudanças na dieta, não tendo sido realizado nenhum exame *postmortem* (Bedford et al., 2013).

7. SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA E

A suplementação com vitamina E permite combater a carência desta vitamina, provocada pela falta de acesso a pastagem e erva fresca (Mcgorum et al., 2006; Finno & Valberg, 2012). Os alimentos processados apresentam alta variabilidade no teor desta vitamina, o que leva a que muitos nutricionistas apenas considerem os ACC (comumente designados por rações e suplementos) como a única fonte de α -tocoferol para suprimir as necessidades diárias (Pagan, 2009).

A diferença entre a vitamina E natural e sintética é a sua estrutura química (Pusterla et al., 2010). A vitamina E utilizada como aditivo em AC é normalmente constituída esteres de α -tocoferol (por exemplo acetato de α -tocoferil), os quais podem ser denominados naturais ou sintéticos, consoante contenham os estereoisómeros RRR (exemplo acetato de RRR- α -tocoferil) ou uma mistura de 8 estereoisómeros (exemplo acetato de all- α -tocoferil), respetivamente (NRC, 2007). Por outro lado, as formas de vitamina E que não contém o grupo éster, podem ser designados por “formas não acetatos”, “não esterificadas” ou “formas micelizadas” (NRC, 2007; Finno & Valberg, 2012).

No caso dos acetatos de α -tocoferol (na forma sintética ou natural), para que estes possam ser utilizados pelo organismo, o éster tem de ser removido e o α -tocoferol sofrer hidrólise por ação dos sais biliares de forma a tornar-se solúvel em água. Estes passos podem limitar a absorção do α -tocoferol nos cavalos. (Kane, Stuart, & Pusterla, 2010).

O acetato all-rac- α -tocoferol é aceite como a medida *standard*, 1 miligrama (mg) = 1 UI (NRC, 2007).

Tabela 1. Várias formas de suplementação com α -tocoferol são fornecidas com os seus componentes e potência relativa (UI / mg), quando comparada com a forma standard - (DL) all-rac- α -Tocoferol (Adaptado de European Union Register of Feed Additives, 2013; C.J. Finno & Valberg, 2012).

Vitamina E	Unidades	
	Miligramas (mg)	Unidades Internacionais (UI)
(D) RRR- α -Tocoferol	1	1.49
(DL) all-rac- α -Tocoferol	1	1.1
Acetato (D) RRR- α -Tocoferol / Tocoferil	1	1.36
Acetato (DL) all-rac- α -Tocoferol / Tocoferil	1	1

7.1. Fontes Sintéticas

O acetato all-rac- α -tocoferol é o mais utilizado pela indústria alimentar. É utilizado como aditivo nos AC com o objetivo de aumentar a concentração de α -tocoferol, pois nem sempre é possível atingir os níveis desejados através das matérias-primas. Ao ser esterificado torna-se mais estável e resistente à oxidação, permitindo manter as concentrações de α -tocoferol no alimento durante o armazenamento (McDowell, 1989).

As formas sintéticas de vitamina E estão disponíveis em várias apresentações: pó, granulado (Finno & Valberg, 2012) e líquido (McDowell, 1989).

7.2. Fontes Naturais

Uma fonte de vitamina E natural (RRR- α -tocoferol), apresenta uma atividade biológica 36% superior a uma fonte de vitamina E sintética (Pagan, 2009).

O α -tocoferol é abundante em forragens verdes (45 a 400 UI/kg de matéria seca (MS)), particularmente no caso da luzerna. No entanto os níveis de α -tocoferol são altamente variáveis em função do tipo de plantas que compõem as forragens. A sua concentração diminui com o estado de maturidade das plantas, colheita e armazenamento (NRC, 1989; Pagan, 2009).

As plantas num estado de maturidade mais avançado apresentam menor relação folha: caule, logo níveis de α -tocoferol mais baixos, pois as folhas contém maior concentração de α -tocoferol do que os caules (Müller, Möller, Jensen, & Udén, 2007).

Verificou-se ainda que a silagem conserva melhor a concentração de α -tocoferol do que a fenação, e a oxidação é maior com o aumento da exposição a radiação ultravioleta e ao calor. O momento do corte, bem como o método e a duração da secagem influenciam os níveis de α -tocoferol do produto final (Müller et al., 2007). Sabe-se que em forragens armazenadas a concentração de α -tocoferol pode ser 10 vezes inferior à inicial (Pagan,

2009). A própria humidade dos alimentos é suficiente para permitir a fermentação e o crescimento de fungos, diminuindo drasticamente os compostos naturais de vitamina E presentes nos mesmos (NRC, 1989).

A vitamina E também é abundante no gérmen de grãos e óleos resultantes da prensagem do gérmen (óleo de gérmen de trigo, 1330 UI/kg). Óleos vegetais, tais como o óleo de milho e de soja, são relativamente ricos em vitamina E (50-300 UI/kg), no entanto contém níveis elevados das formas gama e delta-tocoferol, que possuem pouca ou nenhuma atividade biológica (Pagan, 2009). No caso dos grãos, a moagem quebra a semente e expõe os lípidos insaturados ao ar, promovendo a sua peroxidação (NRC, 1989).

Estudos recentes têm evidenciado diferenças consideráveis na utilização de fontes de vitamina E naturais face às sintéticas e das formas não esterificadas face aos acetatos (Pusterla et al., 2010).

Pusterla et al. (2010) num trabalho experimental realizado com equinos, no qual avaliou a concentração de α -tocoferol no soro e no LCR após a suplementação com vitamina E natural (10.000 UI de d- α -tocoferol não esterificado / 500 kg cavalo /dia) e vitamina E sintética (10.000 UI de acetato dl- α -tocoferil / 500 kg cavalo /dia) em grupos de animais distintos, durante 14 dias, verificou que a concentração de α -tocoferol no soro e no LCR foi significativamente superior face aos valores basais no grupo de cavalos suplementados com vitamina E natural em comparação com o grupo suplementado com acetato dl- α -tocoferil.

Recentemente foi sugerido que o RRR- α -tocoferol (só estereoisómeros RRR – forma natural) e o all-rac- α -tocoferol (todos os estereoisómeros – forma sintética) não são equivalentes para a mesma dose e devem ser considerados fármacos em separado. A concentração nos tecidos para cada estereoisómero é sempre mais variável do que a concentração no plasma (Finno & Valberg, 2012).

Em cavalos puro-sangue inglês, verificou-se claramente que a fonte de vitamina E influencia a concentração de α -tocoferol em animais sujeitos ou não a esforço físico. Concluiu-se que a vitamina E de origem sintética (acetato de dl- α -tocoferol) causa elevação nos níveis plasmáticos de α -tocoferol efetivamente menor do que vitamina E natural, e que a forma não esterificada eleva mais as concentrações de α -tocoferol no plasma face às restantes formas, em administrações de curta duração (56 dias) (Pagan et al., 2005). Este fato pode ser explicado pelas formas não esterificadas serem constituídas por micelas com α -tocoferol solubilizado em dimensões reduzidas no seu núcleo interno, maximizando a absorção (Rey et al., 2013).

7.3. Suplementação em Cavalos Saudáveis

A suplementação com vitamina E de equinos saudáveis, pode ser necessária quando não se consegue suprimir as necessidade diárias de cada indivíduo com a quantidade de α -

tocoferol fornecida na forragem. A quantidade de vitamina E que deve ser ingerida por um equino varia em função da fase de crescimento, nível/intensidade do exercício físico a que um animal está sujeito e no caso de éguas de criação, em função da actividade reprodutiva ou fase de aleitamento (NRC, 2007; Pagan, 2009).

De acordo com o Nutrient requirements of Horse (NRC, 2007), as necessidades diárias de manutenção em vitamina E situam-se nas 50 UI/kg MS, aproximadamente 1 UI/kg PV, ou seja, para um equino que pese 500 kg devem ser fornecidas cerca de 500 UI de vitamina E diárias (assumindo a ingestão de matéria seca diária de 2% de PV). Esta quantidade de vitamina E será idêntica à que é necessária para suprimir as necessidades de garanhões e éguas fora da época reprodutiva ou em início de gestação.

A suplementação de éguas no final da gestação e início da lactação é vantajosa, na medida em que permite assegurar os níveis de vitamina E no colostro e no leite (Pagan, 2009).

Num estudo recente, 17 éguas puro-sangue inglês foram suplementadas com 2.500 UI de RRR- α -tocoferol diárias nas últimas 4 semanas de gestação, tendo-se verificado um aumento da concentração de α -tocoferol, IgG e IgM no leite bem como da concentração plasmática de α -tocoferol e IgM nos poldros recém-nascidos (Bondo & Jensen, 2011).

Éguas que normalmente apresentam colostro de baixa qualidade, ou que nos anos anteriores os seus poldros tenham apresentado falha de transferência de imunidade passiva, devem ser suplementadas com o dobro da quantidade de vitamina E normalmente fornecida, no mínimo um mês antes e um mês depois do parto (Pagan, 2009).

Para poldros em crescimento e éguas em lactação a quantidade de vitamina E fornecida diariamente deve aumentar para cerca de 2 UI/kg PV, o que é equivalente a 80 UI/kg MS assumindo que nestes animais a matéria seca ingerida diariamente é cerca de 2,5 % do peso vivo (NRC, 2007).

O *stress* oxidativo tem sido associado ao exercício intenso e exercício prolongado de resistência (Williams & Carlucci, 2006). Ao identificar-se uma relação entre os níveis de vitamina E do organismo e a rabdomiólise de esforço, e o potencial dano oxidativo do aparelho músculo-esquelético durante o exercício, desenvolveu bastante o interesse por quantificar a quantidade de vitamina E que cavalos em trabalho devem ingerir (NRC, 2007). Em cavalos de alto rendimento são comuns alterações musculares induzidas pelo exercício e estas têm sido sugeridas como causa da produção de radicais livres durante o esforço físico (Siciliano et al., 1997).

O NRC (2007) recomenda que cavalos com nível de exercício baixo, moderado e elevado devem ingerir 1.6, 1.8 e 2 UI/kg PV de vitamina E respetivamente (assumindo uma ingestão de MS de 2% PV para nível de exercício baixo, 2.25% PV para nível de exercício moderado e 2.5% PV para nível de exercício elevado) (Tabela 2.).

Tabela 2. Quantidade de vitamina E (UI / kg de PV) recomendada para diferentes classes de equinos, com ingestão diária de MS na ordem dos 2-2,25 %, segundo o NRC (2007).

Classes de Equinos	Vitamina E (UI/kg PV)	Ingestão diária de MS (% de PV)
Adultos sedentários, Garanhões, Éguas de reprodução, Éguas gestantes	1	2
Adultos em exercício ligeiro	1.6	2
Adultos em exercício moderado	1.8	2.25
Adulto em exercício elevado, Éguas lactantes, Poldros em crescimento	2	2.5

7.4. Suplementação em Cavalos com Doenças Neurológicas

Os equinos que apresentam doenças neurológicas têm necessidades de vitamina E acrescidas face aos cavalos saudáveis. Provavelmente esta situação é causada pelo dano oxidativo associado a doenças neurológicas provocadas por carência de antioxidantes e pelo aumento da metabolização desta vitamina no LCR (Higgins et al., 2008). O objetivo da suplementação com α -tocoferol em equinos com predisposição ou afetados por DNME, DNA/MDE e miopatia por carência de vitamina E é o de aumentar a concentração de α -tocoferol no SNC e no tecido muscular. Muitas publicações na literatura veterinária recomendam suplementação com doses elevadas de vitamina E para estes casos, variando desde 1.500 UI até 12.000 UI/500 kg PV/dia (Finno & Valberg, 2012).

A maioria das vezes o uso da vitamina E em alterações neurológicas tem uma base empírica, acreditando-se que possa servir como neuroprotetor em doenças relacionadas com a carência de vitamina E. No entanto, é importante não esquecer que muitas doses recomendadas excedem os valores considerados seguros pelo NRC (2007) as quais referem 20 UI/kg PV (10.000 UI/500kg cavalo). Além disso, muitos estudos foram efetuados antes de algumas formas de vitamina E naturais estarem disponíveis e estas quando usadas fornecem maior quantidade de α -tocoferol face às fontes sintéticas. Até ao momento, não há evidência científica que a suplementação com doses de α -tocoferol acima das recomendadas pelo NRC (2007) tenha efeito terapêutico em equinos que sofram de doenças neurológicas ou outras associadas à carência de vitamina E (Finno & Valberg, 2012).

Num estudo onde 3 grupos de equinos, diagnosticados com problemas neurológicos, foram suplementados com 5.000 UI d- α -tocoferol não esterificado natural solúvel em água, 10.000 UI d- α -tocoferol não esterificado natural solúvel em água e 10.000 UI de acetato dl- α -tocoferil respectivamente, por dia, durante 14 dias, verificou-se que a vitamina E natural

apresentava uma maior biodisponibilidade, quando comparada com uma quantidade equivalente de UI de vitamina E sintética. O d- α -tocoferol micelizado natural solúvel em água atravessou a BHE de forma mais eficiente, quando comparado com a mesma quantidade de UI de vitamina E sintética. Esta última ao fim de 14 dias de suplementação, não demonstrou um aumento efetivo na concentração de α -tocoferol do LCR (Kane et al., 2010).

Como a manutenção de concentrações normais de α -tocoferol no LCR é essencial para a função neurológica, principalmente quando a função cerebral está alterada devido a doenças neurológicas degenerativas, traumáticas ou inflamatórias (Kane et al., 2010; Pusterla et al., 2010), vários autores recomendam que o RRR- α -tocoferol (não acetato) seja utilizado nos ACC de equinos que sofram de DNME, DNA/MDE ou miopatia por carência de vitamina E, pois esta forma é biologicamente mais disponível, mais rapidamente absorvida e tem atividade antioxidante mais potente (Pusterla et al., 2010; Finno & Valberg, 2012).

8. TOXICIDADE

A vitamina E ao contrário de outras vitaminas lipossolúveis não se acumula no organismo em níveis tóxicos devido a mecanismos protetores. As concentrações de α -tocoferol inter- e intra-plasmáticas são relativamente constantes apesar da suplementação, sugerindo que fatores genéticos determinam as concentrações de vitamina E in vivo. A excessiva suplementação com α -tocoferol pode aumentar a concentração nos tecidos e no plasma/soro, contudo há grande evidência de que os tecidos ficam saturados e o α -tocoferol adicional será metabolizado e/ou excretado (Finno & Valberg, 2012).

Em cavalos sujeitos a exercício intenso e suplementados com vitamina E, 10 vezes acima do valor recomendado, demonstrou-se não haver benefício ao nível do grau de stress oxidativo e estado antioxidante. De facto, pode ser prejudicial, uma vez que parece interferir com a absorção de β -caroteno (Williams & Carlucci, 2006).

As complicações e toxicidade associadas à suplementação em equinos com doses elevadas de vitamina E são consideradas mínimas e os valores de segurança descritos são baseados em problemas verificados noutras espécies animais. Algumas destas espécies, quando suplementadas com uma quantidade de vitamina E acima de 1.000 UI/kg MS, apresentaram coagulopatias e alterações na mineralização óssea. No caso dos equinos, considerando a dose de segurança 1.000 UI/kg MS (igual a 20 UI/kg PV), para um cavalo de 500 kg com uma ingestão diária de 2% PV, obtém-se um valor máximo de 10.000UI/dia de vitamina E (NRC, 2007).

III. DOENÇA DO NEURÓNIO MOTOR DOS EQUINOS

1. HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA

O primeiro caso de doença do neurónio motor em equinos (DNME) foi descrito em meados dos anos 80 (DeVilbiss et al., 2009), tendo sido identificados e reportados mais de 200 casos entre 1985 e 1997. Quase todos os estados norte-americanos tiveram pelo menos um caso registado durante esse período (Furr & Reed, 2008).

Até 1997 o número de casos reportados anualmente à Universidade de Cornell aumentou a cada ano, depois verificou-se um decréscimo da incidência de casos (DeVilbiss et al., 2009). Embora inicialmente a doença parecesse estar restrita ao nordeste dos Estados Unidos, com forte incidência na Nova Inglaterra, verificou-se uma acentuada dispersão para Oeste e para o Sul, e mais tarde para vários países do mundo (Furr & Reed, 2008). Há registo de casos na Grã-Bretanha, Canada, Irlanda, Suíça, Bélgica, Japão, Brasil, Holanda, Finlândia (Furr & Reed, 2008) e em Portugal (M. Mira, M. Minas, P. Tilley, T. Fino, comunicação pessoal, Fevereiro, 2012).

Desde que foram identificados os primeiros casos, nos Estado Unidos e no Canada, o diagnóstico de DNME aumentou consideravelmente (Furr & Reed, 2008). Esta situação pode ser explicada pela necessidade de adoção de medidas preventivas em animais com risco de desenvolver a doença (Reed et al., 2010), pelo aumento da consciência e da sensibilidade no reconhecimento dos sinais clínicos por parte de veterinários e proprietários (Furr & Reed, 2008) e devido ao desenvolvimento de testes de diagnóstico auxiliares (Moore, Collatos, Ortenburger, Illanes, & Ikede, 1994).

A doença normalmente tem carácter esporádico, no entanto após ser diagnosticado um caso num determinado local é normal que nos 2 anos seguintes ao diagnóstico original se identifiquem mais casos (Frape, 2004).

Em 1991, no Brasil verificou-se uma situação fora do comum, numa só cidade foram diagnosticados 80 casos de DNME, em animais pertencentes à cavalaria da polícia, (Divers, Mohammed, Hintz, & de Lahunta, 2006).

A idade de início da doença, os sinais clínicos e os resultados registados na Europa são muito semelhantes aos valores indicados para os casos norte-americanos, sendo que nos Estados Unidos a idade varia entre 2 e 23 anos, ao passo que na Europa foi reportada entre 2 e 27 anos (McGorum ; et al., 2006Furr & Reed, 2008). A nível da idade com maior risco de desenvolver a doença, foi descrito que o risco aumentava até aos 15 ou 16 anos, altura a partir da qual se verificava um declínio (Mohammed et al., 1993; Furr & Reed, 2008). Em casos de doença do neurónio motor (DNM) em humanos, verificou-se que os indivíduos mais velhos são mais suscetíveis de serem afetados (Mohammed, Divers, Summers, & de Lahunta, 2007).

Existe na literatura referência a um caso diagnosticado num poldro de 9 meses, contudo é um caso isolado e não há mais nenhum registo de casos de DNME em idades tão precoces (Furr & Reed, 2008).

O primeiro estudo realizado com o objetivo de tentar identificar os fatores de risco associados ao desenvolvimento desta doença, realizou-se nos Estados Unidos, com 32 cavalos diagnosticados com DNME entre 1985 e 1991. Foram avaliados fatores como a idade, o sexo e a raça. Das 7 raças (Quarto-Milha, Puro-Sangue Inglês, Standardbred, Morgan, Tennessee Walker, Árabe, Cruzados) representadas, a raça Quarto-Milha era a mais numerosa seguida dos Puro-Sangue Inglês (Mohammed et al., 1993).

Na universidade de Cornell, entre 1990 e 1993, avaliaram-se 28 casos de DNME dos quais 26 tinham história de terem estado pelo menos um ano fechados num *paddock*, alimentados com quantidades elevadas de concentrado e feno de má qualidade. A equipa responsável pelo estudo verificou que os níveis de vitamina E no plasma estavam significativamente baixos, quando comparados com os casos controlo. Neste caso, a raça Quarto-Milha também foi a mais representada (Lofstedt & Ikede, 1994; Furr & Reed, 2008). Pensa-se que a ocorrência elevada de DNME nesta raça possa estar relacionada com o modo como estes cavalos são alojados e alimentados, em detrimento de uma alteração genética primária (Mohammed et al., 2007).

Nos Estados Unidos, alguns cavalos com DNME e história de acesso a pastagem, tinham doença infiltrativa intestinal e/ou doença hepática crónica, que provavelmente comprometia a absorção intestinal (Divers et al., 2006). Neste país, a incidência anual de DNME varia com a região, indo de 0 a 2,78 por 100.000 cavalos na Nova Inglaterra (Mohammed et al., 2007).

Desde que foi confirmado histopatologicamente o primeiro cavalo com DNME na Bélgica, muitos outros casos surgiram por toda a Europa. No entanto, nos anos seguintes não surgiram quaisquer estudos epidemiológicos nos cavalos europeus. Só em 2006 foi publicado um estudo composto por 32 casos confirmados histopatologicamente entre 1996 e 2004, em hospitais universitários e clínicas de referência de vários países europeus (McGorum et al., 2006).

Num estudo efetuado com base em cavalos que foram observados na Universidade de Cornell entre 1 de Janeiro de 1990 e 31 de Dezembro de 1995, verificou-se existir uma associação negativa entre os níveis de vitamina E no plasma e o risco de contrair a DNME (de la Rúa-Domènech et al., 1997). Foi efetuado um inquérito aos médicos veterinários do nordeste dos Estados Unidos, com o objetivo de verificar qual a sua perceção em relação à ocorrência de doenças neurológicas em equinos, durante um período de 10 anos compreendido entre 1 de Junho de 1997 e 1 de Junho de 2007. A informação resultante, foi cruzada com dados do Hospital Equino da Universidade de Cornell (DeVilbiss et al., 2009) e verificou-se que 76,5% dos entrevistados não diagnosticou casos de DNME nos últimos 12 meses desse período, 53% achou que a frequência da doença se manteve constante, enquanto 25% indicou que tem diminuído. Os veterinários justificaram a redução da incidência da doença com o aumento da suplementação com vitamina E em cavalos sem

acesso a pastagem, com o aumento da formação dos clientes, menores dificuldades de diagnóstico, melhor dieta, seleção genética e reconhecimento precoce da doença com tratamento da mesma. A análise da base de dados da Universidade de Cornell, suporta a percepção de uma diminuição da incidência da DNME, neste período (DeVilbiss et al., 2009).

Na Finlândia há conhecimento de um cavalo em que foi diagnosticado a DNME, embora tivesse sido suplementado com 300 mg de α -tocoferol por dia, nos 10 anos anteriores ao aparecimento dos sinais clínicos. Neste caso, a suplementação com quantidades excessivas de ferro (Fe) foi sugerida como possível causa (Furr & Reed, 2008).

Estudos realizados indicaram que em estábulos onde anteriormente foram diagnosticados casos DNME e/ou existem fatores de risco suficientes para o desenvolvimento da doença, pode haver uma percentagem baixa de cavalos com DNME no estado subclínico. Cavalos portadores da doença no estado subclínico caracterizam-se por ter um grau de fraqueza muscular permanente com predisposição para lesões (Divers et al., 2006).

O tempo que um animal deve ter de acesso a pastagem de modo a garantir a ingestão de quantidade suficiente de vitamina E não é conhecido e provavelmente é diferente entre animais, pois existem variações individuais (idade, raça, nível de exercício, fatores hereditários não identificados), e variações ao nível da própria pastagem (tipo de forragem e quantidade, época do ano, condições de crescimento). Por esta razão, qualquer cavalo que anualmente tenha menos de 3 meses de acesso a pastagem pode apresentar concentração plasmática de vitamina E inferior ao normal. Há registo de cavalos que desenvolveram DNME com níveis de vitamina E baixos no plasma, apesar dos proprietários referirem que existiu acesso a pastagem em parte do dia, ou ao longo do dia todo (McGorum et al., 2006).

Em 2010, foi relatado um caso de uma mula de 23 anos, que deu entrada na *University of California at Davis-Veterinary Medical Teaching Hospital* com alterações oculares bilaterais e alteração do movimento dos membros pélvicos. A este animal foi diagnosticada mieloencefalopatia protozoária equina (MPE) associada a *Neospora hughesi*. Embora não se tenha realizado o diagnóstico definitivo de DNME, com recurso a biopsia do nervo acessório, a mula apresentava atrofia muscular neurogénica das fibras musculares do tipo I, do músculo sacrocaudal medial dorsal. Juntamente com os depósitos de pigmento corioretiniano bilaterais e rápida perda de peso, levou a que os veterinários responsáveis suspeitassem que também sofria de DNME. Assim sendo, estes concluíram que em animais com alterações nos nervos cranianos, atrofia muscular simétrica prenunciada, alterações incomuns da marcha e retinopatia com pigmento, deve-se considerar a hipótese de MPE associada a *Neospora hughesi* e DNME (Finno, Eaton, Aleman, & Hollingsworth, 2010).

Em 2012 foi avaliada a presença de *Trans-Active Response DNA Binding Protein of 43 kDa* (TDP-43) em neurónios do SNC de cavalos com DNME. Este estudo foi desenvolvido pelo facto de estar descrita a acumulação desta proteína em neurónios do SNC de humanos com alterações neurodegenerativas como esclerose lateral amiotrófica (ELA esporádica. A

equipa de investigação verificou que podem existir algumas diferenças na coloração nuclear de TDP-43 em avaliações histológicas entre equinos portadores de DNME e equinos saudáveis, contudo é preciso conhecer melhor o papel da TDP-43 na etiologia das doenças (El-Assaad et al., 2012).

A evidência epidemiológica suporta a hipótese que a DNME ser multifatorial afetando animais com carências nutricionais que resultam em stress oxidativo (de la Rúa-Domènech et al., 1997).

2. FISIOPATOLOGIA

A doença do neurónio motor em equinos é uma doença que afeta os NMI dos cornos ventrais da medula espinhal e tronco cerebral, sem envolvimento de neurónios motores superiores. Parece ter um carácter espontâneo, progressivo, esporádico e epidemiologicamente não demonstra características de infeção, toxicidade ou hereditariedade (Palencia, Quiroz-Rothe, & Rivero, 2005; Furr & Reed, 2008).

As doenças espontâneas que afetam os neurónios motores são pouco comuns em animais domésticos. Estas têm sido objeto de estudo e verificou-se existir um padrão familiar (Divers, Cummings, de Lahunta, Hintz, & Mohammed, 2006).

Em equinos que manifestam DNME, os níveis de vitamina E no plasma são significativamente mais baixos (Divers, Cummings, de Lahunta, Hintz, & Mohammed, 2006). A história típica destes casos envolve animais com acesso limitado ou sem acesso a pastagem verde (Furr & Reed, 2008), pelo que tem sido sugerido que o desenvolvimento da DNME requer um défice de vitamina E. Em ensaios experimentais com cavalos alimentados com dietas pobres em vitamina E, a manifestação da doença variou entre 21-44 meses (Divers et al., 2006; Mohammed et al., 2007). Quando a doença surge de forma natural, esta ocorre aparentemente após 18 meses de alimentação com dietas com carência de vitamina E (Finno et al., 2010).

Contudo, já se verificaram vários estudos onde nem todos os cavalos que ingeriram vitamina E abaixo dos níveis recomendados desenvolveram DNME. Assim, outros fatores devem contribuir para a suscetibilidade individual de cada cavalo, além da diminuição da ingestão de vitamina E. Destes há que salientar alterações da absorção, do metabolismo ou a retenção de vitamina E alterada, outros antioxidantes da dieta ou antioxidantes sistémicos endógenos insuficientes ou inadequados e a presença de fatores pro-oxidantes em excesso na dieta (Furr & Reed, 2008). Falhas na absorção intestinal de α -tocoferol podem ser devidas a uma disfunção na absorção do epitélio intestinal ou à presença de fatores competidores no intestino, tais como elevados níveis de gorduras polinsaturadas (McGorum

et al., 2006). Suspeita-se que aproximadamente 5% dos cavalos com DNME têm doença intestinal infiltrativa/inflamatória ou insuficiência hepática crônica (Furr & Reed, 2008).

Em relação aos pro-oxidantes, tem sido dada mais importância ao potencial papel do Fe e do cobre (Cu), no entanto, ainda não foi provado que estes contribuam para o desenvolvimento de DNME (Furr & Reed, 2008). Em trabalhos experimentais verificou-se um aumento da quantidade de Cu na medula espinhal dos cavalos onde a doença foi induzida, ao contrário dos casos onde ocorreu naturalmente (Divers, Cummings, et al., 2006; Soffler, 2007), e foi reportada a descoberta de Fe hepático elevado (média de 540 ppm, o intervalo em cavalos normais é 200 – 500 ppm) (Divers, Mohammed, et al., 2006). Pensa-se que tanto o Cu como o Fe podem atuar como fontes pro-oxidantes através de reações químicas que originam iões hidroxil livres. Ao nível das células neurais, estes podem causar alterações de lípidos, ácidos nucleicos e mitocôndrias, causando destruição ou morte dos neurínios e depósitos de lipofuscina (Divers, Cummings, et al., 2006).

Os resultados de investigações desenvolvidas anteriormente sugerem que quando se verifica um défice nas defesas antioxidantes (incluindo a vitamina E) e um excesso da carga pro-oxidante, independentemente da sua origem, os equinos tornam-se mais suscetíveis ao *stress* oxidativo e consequentemente ao desenvolvimento de DNME (Divers, Cummings, et al., 2006; Soffler, 2007).

A atrofia muscular verifica-se principalmente nas miofibrilas do tipo I de cavalos com DNME, as quais têm maior atividade oxidativa quando comparadas com as miofibrilas tipo II, (Furr & Reed, 2008). Em geral, ocorre uma alteração das características metabólicas das miofibrilas, correspondente a uma mudança de fibras lentas/oxidativas para fibras rápidas/glicolíticas. Durante este processo ocorre um aumento da população de fibras híbridas. A transformação do tipo de fibra de miosina também pode ocorrer quando as fibras musculares desenergizadas são reinervadas por axónios de neurónios motores que não correspondem às fibras musculares originais (Palencia et al., 2005; Divers, Mohammed, et al., 2006).

Segundo Palencia et al. (2005) a redução crónica da atividade neuromuscular induzida pela DNME, resulta no aumento da capacidade glicolítica do músculo.

A deposição de lipopigmento observada tanto nas células endoteliais dos capilares da medula espinhal, como na retina, e ocasionalmente no fígado e no intestino, refletem o aumento da peroxidação lipídica, em consequência do *stress* oxidativo generalizado (Secombe & Lester, 2012).

Os sinais clínicos e patológicos da DNME assemelham-se aos relatados na ELA, também conhecida com doença de Lou Gehrigis, uma variante da DNM em humanos para a qual a DNME tem sido considerada um potencial modelo (Polack et al., 2000). Contudo existem diferenças entre ambas, nomeadamente pela ELA afetar NMI e NMS (Reed et al., 2010).

A ELA esporádica constitui 90-95 % dos casos de ELA, enquanto 5-10 % é considerada ELA familiar (Finno & Valberg, 2012). Para esta última, na maioria dos casos foi identificado um defeito genético a nível do gene que codifica a SOD do Cu e do zinco (Zn) no cromossoma 21 (Polack et al., 2000), que conduziu à investigação de mutações comparáveis em equinos afetados com DNME. No entanto, até à data ainda não houve nenhuma evidência que mutações genéticas semelhantes possam estar envolvidas no desenvolvimento da DNME (Soffler, 2007; Reed et al., 2010).

3. SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos da DNME dependem da fase da doença no momento da apresentação e normalmente são classificados em subagudos ou crónicos (Reed et al., 2010; Secombe & Lester, 2012).

Os cavalos afetados com DNME perdem pelo menos 30% dos neurónios motores somáticos na medula espinhal e no tronco cerebral antes de manifestarem sinais clínicos (Polack et al., 1998; Mohammed et al., 2007).

3.1. Forma Subaguda

Os equinos apresentam na forma subaguda fasciculações musculares, tremores, sudação anormal e decúbito excessivo. A cabeça normalmente está ao nível dos ombros ou mais baixa, como atrofia da musculatura cervical (Reed et al., 2010) e a base da cauda levantada (Figura 5.) devido à atrofia muscular, sobretudo ao nível dos músculo sacrococcígeo dorsal medial (Secombe & Lester, 2012). A perda de massa muscular ocorre rapidamente (dias a semanas) sendo mais óbvia nos músculos quadrícepedes, trícepedes e glúteos (Figura 5.). No entanto a atrofia muscular pode não estar presente quando surge sintomatologia compatível com DNME (Furr & Reed, 2008) ou pode começar aproximadamente um mês antes dos outros sintomas. A perda de condição corporal (CC) acompanhada de apetite normal ou mesmo aumentado, é um sinal muito característico (Reed et al., 2010). Em quatro cavalos sujeitos a uma dieta deficiente em vitamina E, verificou-se que perderam em média 92 kg (entre 64 e 115 kg) entre o primeiro ano do estudo e a altura em que começaram a manifestar sinais clínicos compatíveis com DNME (Divers, Cummings, et al., 2006).

Figura 5. Cavalo Lusitano com sintomatologia de DNME. Observa-se elevação da base da cauda (A) e atrofia muscular na zona dos músculos glúteos, músculos quadrícepedes e musculatura da base da cauda - Original.



Os animais afetados mudam a distribuição do peso corporal várias vezes entre os membros pélvicos e têm dificuldade de se manter em estação em áreas reduzidas, adotando uma postura com os membros anteriores mais próximo dos membros pélvicos do que é normal, designada por “base estreita”, devido à falta de força necessária para suportar o seu próprio peso (Figura 6.) (Furr & Reed, 2008; Reed et al., 2010). Quando bastante afetados, há cavalos que ficam mais confortáveis a andar lentamente do que parados, embora mesmo estas pequenas caminhadas possam causar sudação, taquipneia e adejo nasal. Os passos destes cavalos caracterizam-se por uma fase cranial encurtada, no entanto, não demonstram sinais de ataxia tais como interferência entre os membros ou fazer rotação sobre si próprio (“*pivot*”), quando submetidos a círculos apertados (Furr & Reed, 2008; Secombe & Lester, 2012).

Relativamente aos neurónios motores, na DNME há perda destes neurónios nos nervos cranianos V, VII e XII, mas os sinais clínicos raramente são perceptíveis, enquanto que os nervos III, IV e VI normalmente não são afetados (Finno et al., 2010).

Quando os equinos são afetados por esta doença há morte dos neurónios motores e outros apesar de não morrerem ficam disfuncionais. Os sinais clínicos normalmente são determinados pelo grau de recuperação destes últimos. Contudo, como não é possível distinguir os neurónios mortos dos neurónios disfuncionais, em vida, torna-se impossível prever o resultado clínico da forma subaguda (Divers, Mohammed, et al., 2006).

Figura 6. Cavalo Lusitano com sintomatologia de DNME. Observa-se elevada perda de massa muscular e os membros encontram-se bastante concentrados adotando uma postura de “base estreita” (Miguel Minas e Tomé Fino, 2007 – Publicação autorizada).



3.2. Forma Crónica

A forma crónica normalmente é observada após a estabilização da fase subaguda, mas alguns casos podem desenvolver a fase crónica sem nunca manifestar sinais clínicos exuberantes, típicos da fase subaguda (Secombe & Lester, 2012).

Na forma crónica os cavalos têm dificuldade em ganhar peso, fadiga, baixa performance desportiva, e locomoção anormal (movimento de harpejo (Figura 7.)). Embora a atrofia muscular resultante da perda de peso, esteja normalmente presente, o grau pode variar de leve a grave, e alguns cavalos podem parecer magros (Reed et al., 2010).

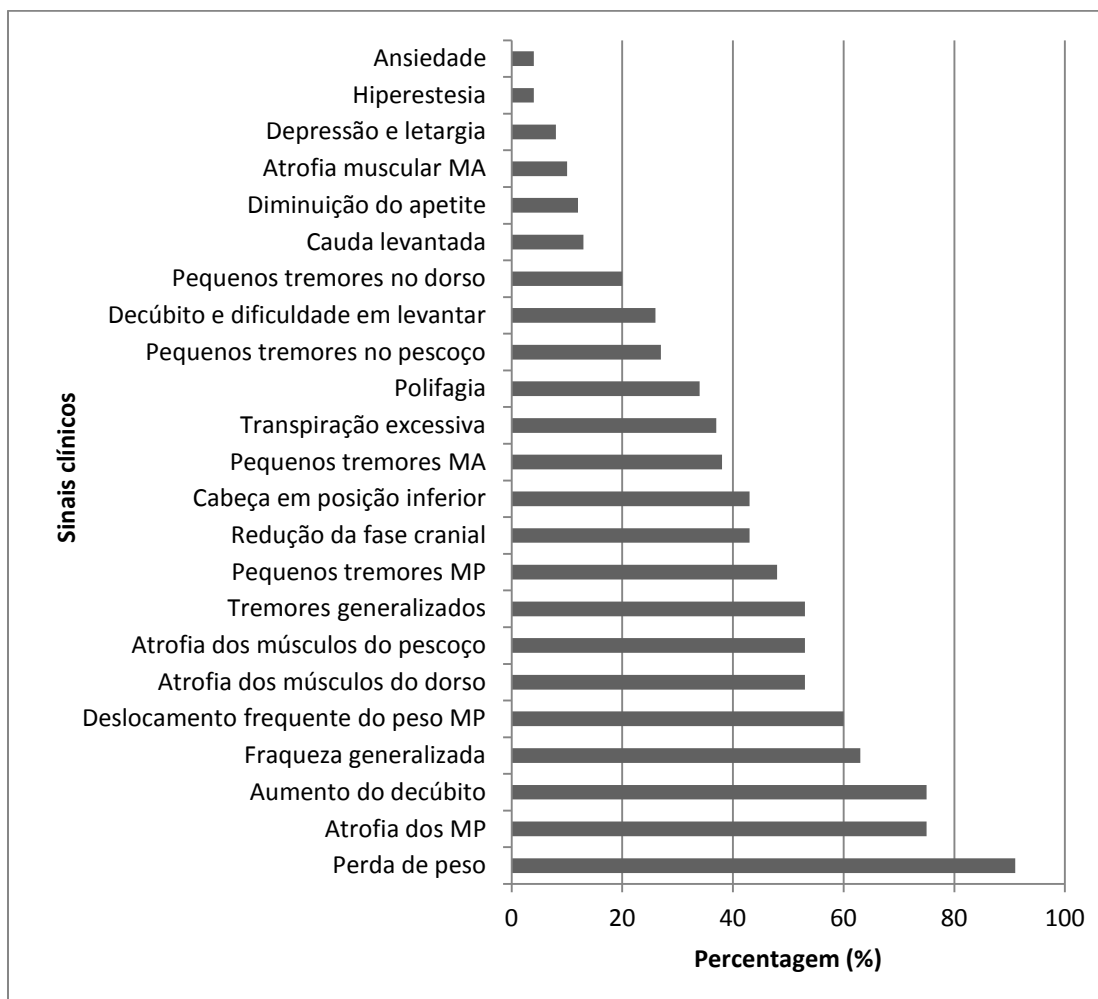
Figura 7. Movimento de harpejo executado por um equino de raça Lusitana severamente afectado pela DNME (Miguel Minas e Tomé Fino, 2007 – Publicação autorizada).



3.3. Forma Subclínica

Equinos com DNME na forma subclínica caracterizam-se por terem menos de 30% dos neurónios motores afetados e ausência de sinais clínicos. No entanto, está aumentado o risco de lesão durante o exercício físico e existe um grau de fraqueza permanente, que nem sempre é detetado pelos proprietários (Divers, Mohammed, et al., 2006).

Gráfico 1. Frequência dos sinais clínicos descritos por proprietários, em 32 casos de DNME na Europa (Adaptado de McGorum et al., 2006).



Legenda. MP: Membros Pélvicos; MA: Membros Anteriores.

4. ALTERAÇÕES OCULARES

A retina é altamente suscetível ao *stress* oxidativo por causa da intensa exposição à luz e ao oxigénio, e pela quantidade elevada de ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) que a constituem, aumentando a predisposição para peroxidação lipídica (Terrasa, Guajardo, Marra, & Zapata, 2009).

Uma alimentação crónica deficiente em vitamina E causa distrofia do epitélio pigmentado, uma retinopatia lipídica, com subsequente acumulação de lipofuscina na área do tapete e fora dela (Riis et al., 1999) (Nell & Walde, 2010).

Ao exame oftalmoscópico de equinos com DNME verifica-se uma acumulação de pigmento amarelo-acastanhado irregular, reticulado ou em favo de mel no epitélio pigmentado da retina (EPR) na área do tapete e fora dela (Wilkie, 2011). Têm sido descritas alterações semelhantes em casos de DNME e de retinopatia senil em equinos, no entanto a ultraestrutura da lipofuscina que se acumula em casos de carência de vitamina E não é idêntica à observada no processo de envelhecimento. Trata-se de uma lipoproteína que representa a parte não digerida dos lípidos oxidados nos fotorreceptores da retina e noutros segmentos, como neurónios, hepatócitos, músculo cardíaco, córtex da adrenal e epitélio pigmentar da retina (EPR) (Riis et al., 1999; Finno et al., 2010).

Na DNME está descrito que alterações do fundo do olho podem ocorrer muito antes dos sinais músculo-esqueléticos serem evidentes e podem ser acompanhadas de défice visual ou cegueira (Nell & Walde, 2010). Estas alterações são identificáveis durante a realização de um eletroretinograma (Riis et al., 1999).

O impacto da acumulação de lipofuscina na função visual permanece pouco claro, pois surpreendentemente a maioria dos cavalos com DNME apresenta pouca ou nenhuma queixa visual, independentemente da gravidade das lesões oftálmicas (Riis et al., 1999; Finno et al., 2010). Embora não sejam normalmente reportados em casos de DNME défices visuais, 50 % dos cavalos afetados têm alterações características do fundo do olho causadas pela acumulação de ceróide/lipofuscina na EPR (Davis, 2011). Em olhos de cavalos pouco afectados a distribuição do pigmento no EPR é desigual na área do tapete e fora dela (Riis et al., 1999).

Na DNME a acumulação de lipopigmento é pronunciada no endotélio capilar na substância cinzenta da coluna vertebral. Nestes casos ocorre presença de macrófagos que substituem os neurónios mortos. (Finno et al., 2010).

5. EXAMES COMPLEMENTARES

Nas análises laboratoriais efetuadas a cavalos com DNME, verifica-se frequentemente a elevação ligeira a moderada da atividade das enzimas musculares, creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST) (Divers, Mohammed, et al., 2006; Secombe & Lester, 2012). Normalmente estes aumentos são registados na fase inicial onde há uma rápida progressão dos sinais clínicos. Em casos crónicos, estas enzimas musculares podem apresentar valores dentro dos parâmetros normais (Furr & Reed, 2008).

Os valores da concentração de vitamina E no plasma de equinos com DNME normalmente

apresentam-se significativamente inferiores ($< 1\mu\text{g/ml}$) ao esperado em cavalos saudáveis (de la Rúa-Domènech et al., 1997; Divers, Mohammed, et al., 2006).

Num estudo realizado com base em 32 casos de DNME detetados na Europa, verificou-se que estes apresentavam níveis de vitamina E compatíveis com carência desta vitamina, não havendo diferença significativa registada entre os animais que tinham acesso a pastagem e os que não tinham acesso a pastagem (McGorum et al., 2006). Foi sugerido que os níveis baixos de vitamina E nos casos de cavalos com DNME com acesso a pastagem podem refletir a utilização excessiva deste antioxidante, devido à exposição a oxidantes ambientais, incluindo Fe, cádmio e chumbo (McGorum et al., 2006).

Na literatura verificam-se discrepâncias nos níveis de vitamina E no plasma que podem ser atribuídas a vários fatores, tais como a ingestão nutricional dos pacientes no momento do diagnóstico (Hussni O Mohammed et al., 2007). Outro ponto importante é o fato dos valores de referência relativos à concentração plasmática de α -tocoferol considerados por diferentes laboratórios apresentarem grande variabilidade. Esta situação pode explicar alguns casos esporádicos em que a doença é diagnosticada *postmortem* mas os níveis de vitamina E se apresentam normais (Secombe & Lester, 2012).

5.1. Absorção / Metabolismo da Glucose

A diminuição da concentração de glucose no plasma, verificada na curva obtida durante os testes de tolerância à glucose oral, ocorre em 50% dos cavalos com DNME (van der Kolk et al., 2005). Apesar de ser um resultado partilhado por vários estudos, existe alguma controvérsia em relação a este tema e o mecanismo associado a este fenómeno ainda não está completamente compreendido (Benders, Dyer, Wijnberg, Shirazi-Beechey, & van der Kolk, 2005).

Nestes estudos realizados com cavalos afectados pela DNME identificou-se elevação da sensibilidade à insulina exógena de 5,6 vezes, quando comparada com os controlos, (van der Kolk et al., 2005) e alterações na atividade e na concentração de co-transportadores $\text{Na}^+/\text{glucose}$, na membrana do intestino delgado. Estas podem resultar na diminuição ou total ausência de absorção de glucose no lúmen intestinal (Benders et al., 2005).

O aumento do metabolismo da glucose foi atribuído ao possível aumento de translocação de GLUT-4. Trata-se de um dos transportadores de glucose entre miócitos, essencial para a absorção de glucose pelo músculo esquelético e pela gordura (van der Kolk et al., 2005).

5.2. Eletromiografia

A eletromiografia (EMG) é um método de avaliação da atividade elétrica do músculo. Apesar de ser pouco utilizado na prática clínica, este é referido na literatura como um método não

invasivo, sensível na detecção precoce de alterações neurológicas (van der Kolk et al., 2005). Contribui para o diagnóstico clínico de muitas doenças dos nervos periféricos que resultam na desinervação funcional das fibras musculares, como a DNME (Kyles et al., 2001; Reed et al., 2010) e para o diagnóstico de miopatias (Kyles et al., 2001; Wijnberg et al., 2010).

A unidade motora é composta pelo neurónio motor e pelas fibras musculares que este inerva. A análise do potencial de ação das unidades motoras é feita através de EMG dos músculos cervicais, faciais, tríceps, dos membros pélvicos e da base da cauda (Reed et al., 2010). Contudo os resultados não são fáceis de obter, devido a artefactos de movimento, principalmente em equinos fracos (Benders et al., 2005).

O resultado da análise quantitativa dos potenciais de ação das unidades motores de cavalos com DNME é bastante diferente quando comparado com cavalos clinicamente normais (Benders et al., 2005). Na DNME verificam-se alterações neurológicas de desinervação e processos de reinervação que incluem atividade espontânea patológica (Kyles et al., 2001; Benders et al., 2005).

Contudo, estes resultados apenas são considerados consistentes com alterações neuromusculares, não indicam a causa específica (Kyles et al., 2001; Benders et al., 2005; Furr & Reed, 2008).

5.3. Biópsia Nervosa e Muscular

As amostras do ramo ventral de nervo acessório da medula espinhal e do músculo sacrococcígeo dorsal medial recolhidas por biópsia (Figura 8.), quando examinadas por patologistas experientes, constituem um método de diagnóstico bastante fidedigno, tendo uma sensibilidade e especificidade de cerca de 90 % (Furr & Reed, 2008; Bedford et al., 2013).

Na biópsia do ramo ventral do nervo espinhal a evidência de degenerescência dos axónios mielinizados está presente nos casos agudos e crónicos (Jackson et al., 1996), no entanto pode ser mais sensível nos casos crónicos (Reed et al., 2010).

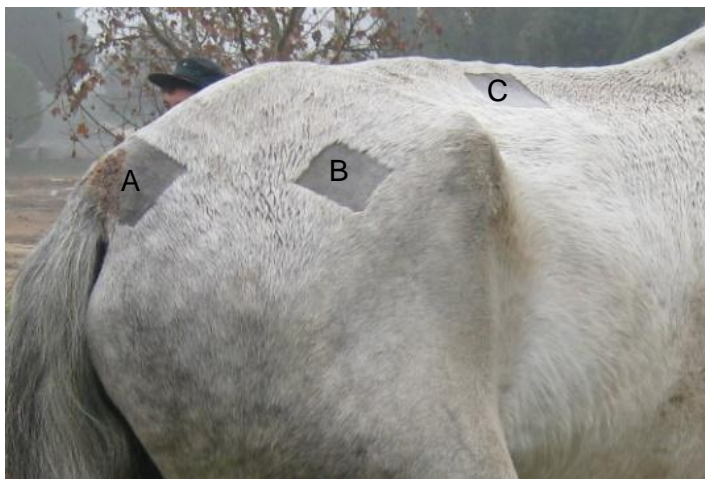
Num exame histológico positivo verifica-se a presença de degenerescência Walleriana nos axónios e proliferação de células de Schwann. Nos casos crónicos é mais evidente a perda de fibras mielinizadas, presença de bandas de Büngner e aumento do colagénio endoneural. A observação clínica da posição anormal da cauda de cavalos com DNME levou à constatação que o músculo sacrococcígeo dorsal medial é predominantemente constituído por fibras tipo I e acessível à biópsia com os animais em estação (Valentine, Divers, Murphy, & Todhunter, 1998). A recolha de uma amostra deste músculo é de fácil execução e a sua avaliação histopatológica tem substituído a avaliação do ramo ventral do nervo acessório (Furr & Reed, 2008).

Durante o procedimento de biópsia deve-se evitar a colocação de anestésico local dentro do músculo, sob pena de alterar a normal arquitetura histológica (Valentine et al., 1998; Ledwith & McGowan, 2010).

A amostra pode ser fixada por congelação ou com formol a 10%. Quando se utiliza formol deve-se garantir que a amostra não tem um diâmetro superior a 0,5-1 cm e que a fixação dura no mínimo 24 horas (Valentine et al., 1998; Ledwith & McGowan, 2010). No entanto esta técnica apresenta a desvantagem de não permitir determinados tipos de coloração, nomeadamente a coloração específica para identificar a miopatia por carência de vitamina E (Bedford et al., 2013). Em cavalos com DNME o exame microscópico do músculo sacrococcígeo dorsal medial pode revelar alterações compatíveis com desenervação atrófica e necrose dispersa (Reed et al., 2010). Num estudo desenvolvido por Palencia et al. (2005) foram observadas fibras individuais dispersas com atrofia angular em 2 casos de DNME com menos de três meses de duração e num caso com duração de um ano, enquanto a atrofia generalizada dos grandes grupos musculares tende a aparecer em cavalos com sinais clínicos de longa duração e decúbito permanente.

A incorporação de biópsias musculares no protocolo de diagnóstico praticado pelos médicos veterinários promove um melhor entendimento das alterações musculares e condições de desenervação (Ledwith & McGowan, 2010).

Figura 8. Locais onde são efetuadas biópsias dos músculos sacrococcígeo dorsal medial (A), glúteo médio (B) e longo dorsal (C), para posterior análise histopatológica (Miguel Minas e Tomé Fino, 2007 – Publicação autorizada).



6. DIAGNÓSTICO

6.1. *Antemorten*

O diagnóstico *antemorten* da DNME geralmente é baseado nos sinais clínicos típicos, nos resultados de testes laboratoriais (Furr & Reed, 2008) e na presença de fatores de risco, como a idade superior ou igual a 2 anos (Secombe & Lester, 2012) e uma dieta pobre em forragem verde e com excesso de pro-oxidantes (DeVilbiss et al., 2009).

A EMG constitui mais um elemento de diagnóstico, juntamente com o aumento moderado da atividade plasmática de CK e AST e a diminuição da concentração de vitamina E ($< 1 \mu\text{g/ml}$) (DeVilbiss et al., 2009; Mohammed et al., 2012; Secombe & Lester, 2012). Deve ter-se em conta que em cavalos saudáveis na pastagem a concentração de vitamina E é variável ao longo do dia e muitas vezes apresenta valores abaixo dos intervalos normais. Assim sendo é recomendado que as colheitas de sangue para ensaios com vitamina E, sejam devidamente programadas (Furr & Reed, 2008).

Estas indicações são sugestivas de DNME, mas não são definitivas ou específicas (DeVilbiss et al., 2009). Situação semelhante ocorre com as retinopatias pigmentares. As quais são mais um sinal clínico, útil quando se constrói o diagnóstico da doença. Cavalos sem sinais sistêmicos evidentes mas que possuam alteração de pigmento no fundo do olho, devem ser considerados apenas como suspeitos de DNME (Riis et al., 1999).

A medição dos níveis plasmáticos de α -tocoferol, pode ser útil para despistar outras alterações neurológicas como disautonomia equina, na qual está reportado que os níveis de vitamina E se encontram dentro dos parâmetros normais (de la Rúa-Domènech et al., 1997). Durante análise histopatológica de amostras de músculo sacrococcígeo dorsal medial de alguns equinos com sinais clínicos de DNME e história de carência de vitamina E não se consegue identificar atrofia neurogénica evidente, pelo que esses cavalos não são diagnosticados *antemorten* com DNME (Finno & Valberg, 2012). Assim, estes casos podem ser responsáveis pela sensibilidade da biópsia do músculo sacrococcígeo dorsal medial no diagnóstico de DNME ser de 90% em vez de 100 % (Bedford et al., 2013).

Muito recentemente foi reportado por Robin, Malbon, Ricci, McGowan, & Malalana (2013) um caso de um pônei macho de 7 anos de idade diagnosticado com DNME após exame *postmortem*. Este animal apresentava alguns sinais clínicos frequentemente identificados nesta doença, como sudação, fasciculações musculares e perda de peso, bem como elevação ligeira das enzimas AST e CK. Atipicamente verificou-se redução acentuada do tônus da língua durante o exame dos nervos cranianos e a língua caída para fora da boca embora esta estivesse fechada. Neste caso não foram detectadas alterações oculares, alterações no exame histológico do nervo acessório, nem alterações na concentração plasmática de α -tocoferol face aos limites normais. Este pônei tornou-se assim no primeiro

caso descrito com estas características; as quais devem ser consideradas quando se tenta diferenciar a DNME de outras entidades clínicas com sintomatologia semelhante, nomeadamente botulismo (Robin et al., 2013).

O diagnóstico definitivo de DNME só é possível realizar com um exame *postmortem* da medula espinhal, núcleo ambíguo e músculo esquelético (Reed et al., 2010).

6.2. Postmortem

O exame *postmortem* é baseado na avaliação da medula espinhal, tronco cerebral, núcleo ambíguo e aparelho músculo-esquelético (Reed et al., 2010).

Apesar dos equinos com DNME apresentarem perda de peso óbvia, os depósitos de gordura, avaliados *postmortem*, normalmente estão nos limites normais (Divers, Mohammed, et al., 2006; Furr & Reed, 2008).

Em casos agudos, existe degenerescência e perda generalizada de neurónios motores somáticos nos cornos ventrais da substância cinzenta da medula espinhal, acompanhados por alterações degenerativas axonais nas raízes ventrais e nervos periféricos (Furr & Reed, 2008). A perda de neurónios ocorre a todos os níveis da medula espinhal, mas é mais evidente a nível cervical e lombar (Reed et al., 2010).

Todos os núcleos dos nervos cranianos do tronco cerebral, à exceção dos nervos cranianos III, IV e VI estão variavelmente envolvidos (Furr & Reed, 2008). Contudo, as alterações são mais evidentes nos nervos V, VII, XII e núcleo ambíguo (Reed et al., 2010). Os neurónios mais afetados podem apresentar sinais de edema, cromatólise, atrofia ou presença de vacúolos (Furr & Reed, 2008).

A deposição de lipofuscina está presente tanto em células endoteliais dos capilares da medula espinhal como na retina e por vezes é encontrada no fígado e no intestino, como reflexo do *stress* oxidativo generalizado (Secombe & Lester, 2012).

Em contraste com a disautonomia equina, na DNME há pouca ou nenhuma lesão do SNA (Furr & Reed, 2008).

O diâmetro normal das fibras musculares dos cavalos é aproximadamente 35 a 70 µm. A sua deservação nos casos de DNME com característica atrofia angular grave das fibras, pode ser simples ou dispersa, ou pode ocorrer em grupos contíguos de 2 ou mais fibras. Normalmente esta encontra-se misturada com fibras marcadamente hipertróficas. Fibrose do endomísio e infiltração de gordura podem estar presentes nos casos mais graves de deservação crónica provocada pela DNME. O núcleo interno das células musculares é facilmente identificado com coloração de hematoxilina e eosina, constituindo uma alteração miopática não específica, característica de casos crónicos de DNME e miopatia por armazenamento de polissacarídeos em equinos. Os núcleos internos podem ser simples ou múltiplos e embora sejam mais frequentes nas fibras hipertrofiadas, podem ocorrer em fibras

musculares de todos os tamanhos (Valentine et al., 1998). Nos músculos dos membros de equinos afetados também pode ocorrer variação do tamanho das fibras, da localização central do núcleo e alterações na coloração mitocondrial (Bedford et al., 2013).

Os diagnósticos diferenciais mais importantes que devem ser considerados incluem laminite, rabdomiólise e cólicas. Outras doenças que podem causar sinais semelhantes são o botulismo, mieloencefalopatia protozoária equina (MPE), miopatia por armazenamento de polissacarídeos, trombose ilíaca, disautonomia equina, e intoxicação por chumbo (Reed et al., 2010).

7. PREVENÇÃO

De forma a prevenir o desenvolvimento da DNME, pode-se fornecer vitamina E natural através de erva fresca e feno de luzerna, a qual apresenta uma concentração de vitamina E superior à maioria das forragens, ou através de AC e ACC (Sauvant, Perez, Tran, & Institut national de la recherche agronomique [INRA] (France), 2002).

Independentemente da idade, todos os equinos que não tenham acesso a forragem verde por períodos prolongados, devem receber suplementação diária com vitamina E, de forma a assegurar a dose mínima diária de 1 UI/kg PV/dia (Divers, Cummings, et al., 2006).

A ação anti-inflamatória do α -tocoferol envolve a inibição da libertação de interleucina-1, inibindo a 5-lipoxigenase. Assim, a suplementação com vitamina E de cavalos com dietas pobres neste antioxidante, protege de alterações oculares (Terrasa et al., 2009).

Rotineiramente utilizam-se 2.000 – 5.000 UI de α -tocoferol/cavalo/dia, mas quantidades mais pequenas provavelmente são suficientes para prevenir o desenvolvimento de DNME (Divers, Mohammed, et al., 2006). Nem todos os alimentos compostos (complementares) comerciais contêm a quantidade de vitamina E necessária para cavalos com carência, como tal a monitorização periódica da concentração plasmática de α -tocoferol está recomendada para equinos em risco de desenvolver DNME (Reed et al., 2010).

8. TRATAMENTO

Até ao momento, nenhum tratamento provou ser realmente eficaz para a DNME. Em casos subagudos, o tratamento com doses anti-inflamatórias de corticosteróides ou antioxidantes não específicos como o dimetilsulfóxido (DMSO), pode ser benéfico (Reed et al., 2010). O único tratamento recomendado para equinos afetados pela DNME é a suplementação com vitamina E, pelo facto destes aparentemente desenvolverem a doença devido ao *stress*

oxidativo provocado pela diminuição da concentração plasmática de α -tocoferol (Furr & Reed, 2008; Reed et al., 2010).

A resposta ao tratamento está dependente do número de neurónios danificados face ao número de neurónios mortos. Como referido anteriormente, ainda não é possível efetuar essa distinção em vida (Reed et al., 2010).

Para cavalos que apresentem sintomatologia de DNME ou em que a doença esteja diagnosticada, está recomendado a administração diária de 5.000-7.000 IU a cada indivíduo (Reed et al., 2010). Em cavalos sujeitos a tratamento com vitamina E, a elevação desta vitamina no organismo nem sempre é regular, o que provavelmente está relacionado com a absorção (Finno & Valberg, 2012; Secombe & Lester, 2012). Com esta dosagem verifica-se o aumento da concentração plasmática de vitamina E igual ou superior a 2 μ g/ml, após 4 a 6 semanas de tratamento, havendo alguns casos que deixam de apresentar sinais clínicos da doença ao fim de 3 meses (Finno & Valberg, 2012). Estão descritos alguns casos que apresentaram alguma melhoria dos sinais clínicos após tratamento, no entanto dificilmente ocorre recuperação total dos animais afetados, porque a morte neuronal é irreversível (Reed et al., 2010). Em cavalos sujeitos a tratamento para a DNME, as lesões na retina não recuperam e o resultado do eletroretinograma não se altera apesar do fornecimento de vitamina E (Riis et al., 1999).

Os ACC normalmente são aditivados com fontes de vitamina E sintética (acetato all-rac- α -tocoferol), no entanto deve ser dada preferência aos ACC que contêm fontes de vitamina E naturais (RRR- α -tocoferol) devido à sua maior biodisponibilidade (Finno & Valberg, 2012). De acordo com estudos recentes, a utilização de formas de vitamina E não esterificadas têm demonstrado ser bastante eficientes quando se pretende elevar os níveis de vitamina E no plasma e no LCR. Resultados recentemente recolhidos em experiências nas quais foram utilizadas diversas fontes de vitamina E, revelam que a melhor opção passa pelo uso de ACC que contenham vitamina E natural na forma não esterificada (Kane et al., 2010; Pusterla et al., 2010) ou o fornecimento de vitamina E natural através de erva fresca (Pagan, 2009).

9. PROGNÓSTICO

O tempo de sobrevivência é variável, podendo os cavalos permanecer estáveis 1 a 6 anos, ou mais, o que pode ser explicado pela diferença na gravidade e duração clínica da doença, juntamente com a disponibilidade económica do proprietário para realizar o tratamento (DeVilbiss et al., 2009).

O prognóstico é reservado e a probabilidade dos equinos afetados retomarem a atividade normal é reduzida. Existem poucas publicações em relação à taxa de sobrevivência e ao

acompanhamento de cavalos com DNME (Reed et al., 2010). Após o início dos sinais clínicos, cerca de 20 % dos cavalos continua a piorar e são submetidos a eutanásia. Aproximadamente 40 % dos cavalos afetados demonstram estabilização dos sinais clínicos, mas continuam com CC magra por não conseguirem ganhar massa muscular e desenvolvem alterações graves nos andamentos. Durante o primeiro ano, após o início dos sinais clínicos, o agravamento acaba por levar à eutanásia. Os restantes casos (cerca de 40 %) apresentam uma melhoria significativa da sintomatologia clínica depois de serem efetuadas alterações no manejo alimentar, como a introdução de alimentos complementares ricos em vitamina E. Alguns destes casos recuperam a massa muscular e retomam a aparência normal (Divers, Mohammed, et al., 2006; DeVilbiss et al., 2009; Reed et al., 2010). Contudo, frequentemente ocorrerem recaídas associadas ao retorno de exercício físico mais intenso ou competição, mesmo em cavalos que aparentemente recuperaram. Estas podem dever-se a morte prematura dos neurónios que permaneciam saudáveis (Furr & Reed, 2008; Reed et al., 2010).

IV. ESTUDO

1. OBJECTIVO

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo retrospectivo de oito casos de DNME, identificados em cavalos sem acesso à pastagem sujeitos ao mesmo regime alimentar, no período de 2007-2009 em Portugal. Pretendeu-se ainda, fornecer uma noção geral da quantidade de vitamina E que pode ser disponibilizada a cavalos recorrendo a AC e ACC para equinos, existentes no mercado português.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostra do estudo

Informação recolhida do registo de casos clínicos de DNME, tendo a amostra sido selecionada com base nos seguintes critérios de inclusão: cavalos sem acesso à pastagem sujeitos ao mesmo regime alimentar; cavalos que manifestaram sinais clínicos compatíveis com DNME no período de 2007-2009, apenas cavalos presentes em território nacional e cavalos que foram sujeitos a biópsias de tecido muscular ou nervoso e o resultado da análise histopatológica foi compatível com o diagnóstico de DNME.

A escolha dos AC a avaliar, foi feita com base na experiência de campo adquirida ao longo da realização deste trabalho e do estágio curricular, pretendendo obter uma noção genérica da quantidade de α -tocoferol que os equinos ingerem, quando estes alimentos são incluídos na sua dieta.

No caso dos ACC, escolha dos produtos a avaliar foi feita com base na informação fornecida por uma loja de produtos para equinos, com o intuito de avaliar produtos normalmente utilizados por proprietários, em Portugal.

2.2. História Clínica

Foi recolhida a história clínica dos oito cavalos que compõem a amostra do estudo com base em relatos do proprietário e em registos dos médicos veterinários assistentes.

2.2.1. Período de estabulação

Para os equinos de presente estudo, foi registado o tempo que decorreu desde o momento em que foram recolhidos do campo e estabulados em boxe até começarem a manifestar alterações físicas e comportamentais.

2.2.2. Maneio alimentar

De acordo a informação disponibilizada pelo proprietário, foi efectuado o registo do tipo alimento e da quantidade do mesmo que estava a ser fornecida aos cavalos no momento em que estes começaram a manifestar sintomas compatíveis com DNME.

2.2.2.1. Estimativa da quantidade de vitamine E presente no AC fornecido aos equinos pertencentes à amostra do estudo

Com base na informação disponibilizada no rótulo do AC que os animais com suspeita de DNME estavam a ingerir, efectuou-se a estimativa da quantidade de vitamine E que este podia fornecer aos cavalos. Assim, pretendeu-se indicar a quantidade aproximada de vitamina E que cada cavalo ingeria diariamente, ao serem fornecidos 4 kg do respetivo alimento.

2.2.3. Actividade física

Foi recolhida a informação relativa à actividade física de cada equino, que compõe a amostra do estudo, com base nos registos do proprietário.

2.3. Exame Clínico

Foi realizado um exame de estado geral a todos os equinos da amostra. Foram efetuadas medições de temperatura (T), FR, FC, tempo de repleção capilar (TRC) e pulso (P). Avaliou-se a CC, a coloração das mucosas, estado de desidratação através da prega de pele (PP) e pulso digital (PD) nos quatro membros. Seguidamente avaliaram-se os andamentos de cada cavalo num exame dinâmico. Para tal os cavalos foram observados a executar os três andamentos - passo, trote e galope, em linha reta e em círculos nos dois sentidos.

2.4. Exames Complementares

2.4.1. Análise das amostras de sangue

No momento do exame clínico foram colhidas amostras de sangue a cada cavalo, acondicionadas em tubos apropriados contendo heparina e ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) para posterior realização de análises bioquímicas e hemograma, respetivamente.

Foi efectuado o registo das condições de transporte das amostras de sangue dos equinos do estudo.

2.4.2. Análise das biópsias musculares

Foram realizadas biópsias musculares dos músculos sacrococcígeo dorsal medial, longo dorsal e glúteo médio, aos equinos que apresentavam sinais clínicos compatíveis com DNME e a 5 equinos saudáveis. A amostra de tecido do músculo sacrococcígeo dorsal medial foi efetuada com recurso a uma pequena incisão local. Enquanto as amostras dos músculos glúteo médio e longo dorsal foram colhidas com recurso a uma agulha de Bergström. Ambos os procedimentos se realizaram após preparação cuidadosa do campo cirúrgico e sob sedação e anestesia local.

As amostras de tecido muscular colhidas, após acondicionamento e identificação, foram enviadas para o Laboratório de Biopatologia Muscular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Córdoba para análise histopatológica.

2.5. Exame *Postmortem*

Um dos equinos que apresentava sinais clínicos bastante exuberantes, foi sujeito a eutanásia. No exame *postmortem*, efetuou-se colheita de: plexo braquial, plexo lombosagrado, medula espinhal (cervical, torácica e lombo-sagrada), tronco cerebral e diencefalo. As amostras foram devidamente acondicionadas, identificadas e enviadas para o Laboratório de Biopatologia Muscular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Córdoba. De igual forma se procedeu ao envio de amostras com o mesmo conteúdo para o Laboratório de Anatomia-Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

2.6. Estimativa da quantidade de vitamina E presente em alimentos compostos e alimentos compostos complementares disponíveis no mercado português

Efectoou-se o registo do valor referente à quantidade de vitamina E indicado no respectivo rótulo de 3 AC e 3 ACC existentes no mercado português, com o objetivo de realizar uma estimativa da quantidade de vitamina E que estes fornecem.

2.6.1. Comparação da quantidade de vitamina E estimada previamente que é disponibilizada por alguns AC, quando fornecidos a cavalos com diferentes níveis de actividade física de acordo com o sugerido pelo National Research Council (2007).

Utilizou-se a quantidade de vitamina E estimada previamente, que é fornecida por alguns AC presentes no mercados português, tendo em conta a informação disponibilizada no rótulo dos mesmo. Juntamente com os valores de vitamina E aconselhados pelo NRC

(2007) para suprimir as necessidades diárias, foram criados 2 casos clínicos fictícios de forma a ilustrar a quantidade de vitamina E aproximada que é fornecida a equinos que tenham regimes alimentares compostos por estes alimentos.

2.7. Análise de dados

Os dados recolhidos ao longo do presente estudo foram armazenados e tratados no programa informático Microsoft Office Excel 2007®, a partir do qual foram elaboradas tabelas e gráficos. Relativamente à variável “Período de estabulação” foi calculada a média, mediana, mínimo, máximo e desvio padrão.

3. RESULTADOS

3.1. Amostra do estudo

A amostra deste estudo é constituída por oito equinos machos de raça lusitana todos oriundos da mesma coudelaria. Os cavalos tinham idades compreendidas entre 4 e 5 anos (6 cavalos com 4 anos e 2 cavalos com 5 anos) no momentos em que começaram a apresentar sinais clínicos compatíveis com DNME.

No caso dos AC, utilizaram-se dados de 3 gamas diferentes, equivalentes entre cada marca. Optou-se por um produto de gama baixa (GB), um produto de gama alta (GA) e um produto da gama indicada para poldros.

Para os ACC escolheram-se 3 produtos de marcas diferentes.

3.2. História Clínica

Na coudelaria a que os equinos da amostra deste estudo pertencem os poldros nascem em terrenos vedados onde as progenitoras se encontram a pastar e são separados destas quando é efetuado o desmame, por volta dos 6 meses. Os terrenos disponíveis para alimentação dos animais são constituídos por pastagens permanentes e uma parte por pastagens de regadio, de forma a diminuir os efeitos do elevado encabeçamento da propriedade e de forma a prolongar a disponibilidade de alimento nas estações mais secas. Posteriormente ao desmame, os poldros permanecem na pastagem, divididos por lotes consoante o ano de nascimento, até cerca dos 3 anos. Nesta idade são fechados em boxe e é iniciado o desbaste, enquanto as poldras permanecem no campo.

Em meados de 2007, num centro hípico onde se encontrava um dos poldros da coudelaria, verificou-se que este apresentava alterações nos andamentos, nomeadamente ataxia ligeira ao nível dos membros pélvicos. Embora, no momento em que evidenciou os primeiros

sintomas este equino não estivesse na propriedade de origem, o seu manejo e alimentação eram semelhantes aos restantes poldros da coudelaria, incluindo a marca e a quantidade de alimento concentrado disponibilizado. Passado pouco tempo, na coudelaria de origem, um grupo de poldros estabilados começou a manifestar sintomas semelhantes.

Todos os 8 equinos da amostra se encontravam em regime de estabilação, tais como os restantes, eram alimentados diariamente com palha à discrição e 4 kg de AC, dividido em 2 tomas. Segundo o fabricante, o AC consistia numa mistura de cereais elaborada de acordo com as necessidades dos equinos, à qual eram aditivadas 17 mg de vitamina E (sintética) por kg.

Na sequência destes acontecimentos o proprietário contactou o representante da marca do AC em causa, tendo este aconselhado fornecer o dobro a quantidade de AC. Desta forma, durante algum tempo, os cavalos foram alimentados com cerca de 8kg de AC por dia, passando a ser ingeridas 136 mg de vitamina E, de acordo com o especificado no rótulo do respetivo alimento.

Nos meses seguintes foram identificados diversos sintomas, com diferentes graus de gravidade entre indivíduos, neste lote de animais e noutros que mais tarde viriam a desenvolver sintomatologia semelhante.

O criador e proprietário começou por identificar que alguns animais passavam mais tempo deitados, apresentavam perda de peso, difícil de inverter apesar do aumento da quantidade de AC fornecida, letargia, cifose lombar e ligeira ataxia dos membros pélvicos. Quando estavam em estação os cavalos afetados adotavam uma postura de “base estreita”, mudança frequente de peso entre os membros pélvicos, cabeça ao nível dos ombros e alguma dificuldade de mastigação.

Com o passar do tempo, alguns equinos começaram a evidenciar sintomas marcados, apresentando tremores e fasciculações musculares, elevação da base da cauda, perda de massa muscular grave e descoordenação motora acentuada dos membros pélvicos. Nos andamentos de trote e galope os equinos manifestavam falta de protração dos membros pélvicos e no galope um defeito na dissociação dos membros pélvicos, criando um movimento tipicamente designado por “galope de coelho”. Com o objetivo de identificar e solucionar o problema, o proprietário procurou ajuda médico-veterinária, sendo realizada uma avaliação exaustiva dos animais afetados.

3.2.1. Período de estabilação

O proprietário, gentilmente, disponibilizou a informação referente à duração do regime de estabilação a que os equinos estiveram sujeitos, desde que foram encerrados em boxe até até começarem a manifestar alterações físicas e comportamentais.

O período de estabulação para cada indivíduo foi registado em meses como indicado na tabela 3.

Verificou-se que o “equino 2” foi o que esteve menos tempo estabulado até manifestar sinais clínicos associados à DNME, 14 meses, enquanto que o “equino 7” foi o que demorou mais tempo, cerca de 36,5 meses. Considerando todos os indivíduos da amostra, em média, estiveram 22,8 meses estabulados e sujeitos a trabalho ligeiro antes de apresentarem um quadro clínico coincidente com início da DNME.

Tabela 3. Dados descritivos em relação ao “Período de estabulação”.

Equinos	Período de estabulação (meses)
1	15,1
2	14,0
3	16,9
4	26,2
5	16,7
6	21,3
7	36,5
8	36,0
Média	22,8
Mediana	19,1
Mínimo	14,0
Máximo	36,5
Desvio Padrão	9,14

3.2.2. Maneio alimentar

Os equinos afetados antes de estarem estabulados encontravam-se na pastagem em regime extensivo, tal como os restantes poldros da respectiva coudelaria. Além da disponibilidade de pastagem era fornecido AC em grupo, pelo que a quantidade ingerida por cada indivíduo não é conhecida.

O regime alimentar do grupo de equinos estabulados, do qual faziam parte os animais suspeitos de terem DNME, consistia em palha e cerca de 4 kg de AC por dia, dividido em duas tomas. Por indicação do fabricante, a quando da manifestação dos primeiros sinais clínicos em alguns animais, o proprietário passava fornecer o dobro da dose inicial, ou seja, 8 kg de AC, durante algum tempo.

3.2.2.1. Estimativa da quantidade de vitamina E presente no AC fornecido aos equinos pertencentes à amostra do estudo

De acordo com o rótulo, o AC fornecido aos equinos do estudo era constituído por diversas matérias-primas: sêmea de trigo 15%, aveia 15%, milho 9%, luzerna 9%, sêmea de cevada 9%, bagaço de soja-42% 8,5%, trigo 5%, melaço de cana 5%, entre outras em menor percentagem. A estas eram adicionadas outras substâncias, nomeadamente 17 mg α -tocoferol para cada quilo de alimento.

Realizou-se um pequeno exercício de cálculo, no qual foram considerados os produtos indicados como matérias-primas pelo rótulo, bem como a respetiva percentagem. Assumiu-se que cada matéria-prima fornece a quantidade de vitamina E indicada em Sauvant, Perez, Tran, & INRA (France), 2002. Assim constatou-se que a quantidade de matérias-primas existente em cada quilograma deste AC fornecia 22,5 mg α -tocoferol.

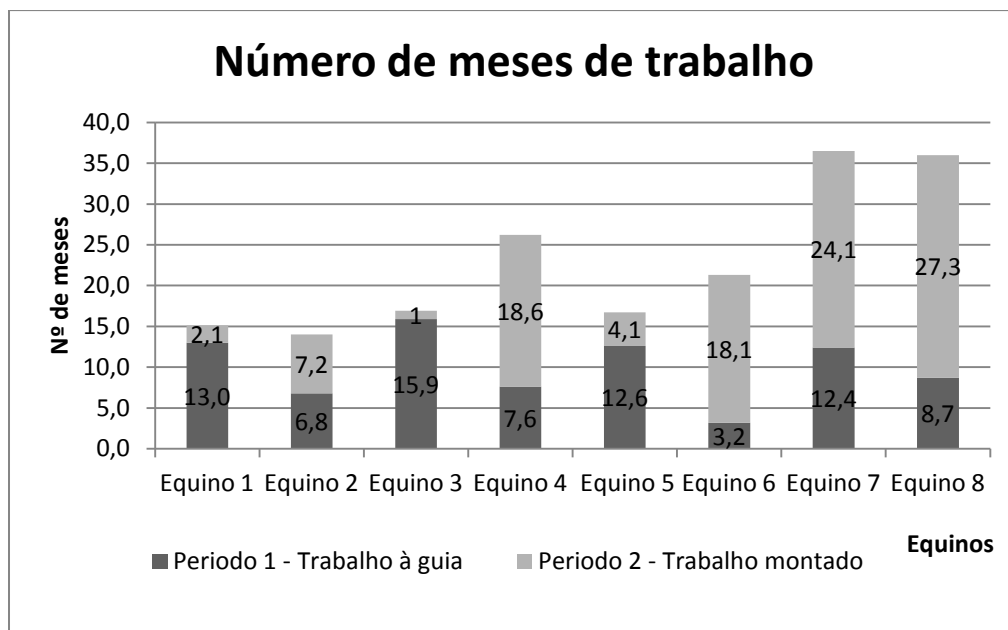
Partindo do princípio que o aditivo é uma fonte sintética (acetato de all-rac- α -tocoferol), juntamente com o α -tocoferol fornecido nas matérias-primas, que se trata de uma fonte natural (RRR- α -tocoferol), verificamos que 4kg deste AC forneciam cerca de 68 mg de acetato de all-rac- α -tocoferol e 90 mg de RRR- α -tocoferol. De acordo com a legislação em vigor (European Union Register of Feed Additives, 2013), corresponde a 68 UI e 134 UI, respetivamente. Desta forma, obtém-se um total 202 UI de α -tocoferol. Embora a vitamina E sintética fornecida em 4 kg do AC utilizado diariamente na alimentação dos equinos afetados, fornecessem 68 UI de α -tocoferol, os cavalos poderiam estar a ingerir cerca de 202 UI de vitamina E através de AC, considerando a vitamina E fornecida pelo aditivo utilizado e pelas matérias-primas presentes.

3.2.3. Actividade física

Os equinos que compõe a amostra do presente estudo tal como os restantes poldros da respectiva coudelaria, antes de estarem estabulados encontravam-se na pastagem em regime extensivo. Assim sendo a sua actividade física durante esse período corresponde ao exercício físico associado a este tipo de regime.

Os cavalos começaram a ser desbastados poucos dias depois de estarem estabulados, iniciando esta fase apenas com trabalho à guia e só posteriormente começaram a ser montados. Assim, o início do trabalho à guia corresponde sensivelmente ao momento em que os animais foram estabulados e iniciaram um regime alimentar diário composto por palha e 4 kg de AC.

Gráfico 2. Distribuição do número de meses de trabalho à guia e trabalho montado, decorridos entre o início do regime de estabulação e o aparecimento dos primeiros sinais clínicos associados a DNME.



3.3. Exame Clínico

Os parâmetros avaliados no exame de estado geral (T, P, FR, FC, mucosas, TRC, PP e PD) encontravam-se todos dentro dos parâmetros normais, há exceção da CC, que era inferior à recomendada, sobretudo nos equinos que apresentavam outros sintomas de forma exuberante.

Durante o exame clínico verificou-se que os equinos afetados apresentavam diferentes graus de gravidade dos seguintes sintomas: perda de peso, letargia, membros concentrados em estação (postura de “base estreita”), alternância frequente de peso entre os membros pélvicos, atrofia da musculatura dorsal (Figura 9.), decúbito prolongado após o trabalho, cabeça em posição inferior relativamente aos ombros e apetite normal ou mesmo aumentado. Nalguns casos mais graves identificaram-se tremores e fasciculações musculares em repouso, cifose da coluna vertebral e grande perda de massa muscular. A atrofia muscular verificada na região da base da cauda originava a sua elevação.

Durante o exame dinâmico verificou-se ataxia dos membros pélvicos, descoordenação motora a passo e trote, movimento de harpejo a passo, em diversos graus de gravidade e galope com os membros pélvicos em simultâneo (“galope de coelho”) (Figura 10.).

Figura 9. Equino Lusitano com DNME, no qual é evidente a perda de massa muscular e a adoção de uma postura com a cabeça ao nível dos ombros, características desta doença – Original.



Figura 10. Equino Lusitano galopando com os membros pélvicos quase em simultâneo (galope de coelho) e com a cauda levantada, sintomas característicos da DNME – Original.



3.4. Exames Complementares

3.4.1. Análise das amostras de sangue

Nos 8 equinos pertencentes à amostra, os valores registados para os parâmetros avaliados no hemograma encontravam-se todos dentro dos intervalos considerados normais (Reed et al., 2010).

As análises bioquímicas só apresentaram alteração das enzimas AST, CK e lactato desidrogenase (LDH), como indicado em baixo, na tabela 4.

Tabela 4. Enzimas AST, CK, LDH com valores alterados, identificados e registados durante as análises bioquímicas efetuadas ao sangue de 6 equinos pertencentes à amostra do estudo.

Equinos	Enzimas		
	AST (U/L)	CK (U/L)	LDH (U/L)
1	--	--	--
2	--	--	--
3	434	226	1124
4	343	235	489
5	550	337	1152
6	459	289	644
7	309	276	393
8	577	465	915
Valores de referência			
Furr Reed (2008)	< 275	< 200	< 420
(Taylor,, Brazil, & Hillyer, 2010)	102 -350	110 - 250	225 - 700
(Reed et al., 2010)	185 -375	100 - 470	225 - 700

Legenda. AST: Aspartato Amino Transferase; CK: Creatina Quinase; LDH: Lactato Desidrogenase; S.R.: sem resultado

Após a recolha das amostras de sangue, os tubos com as amostras foram colocados numa geleira contendo termocomuladores de forma a permitir a refrigeração das amostras até ao laboratório, onde foi efectuada a análise do sangue.

3.4.2. Análise das biópsias musculares

De acordo com o relatório emitido pelo Departamento de Anatomia Patológica Comparadas da Faculdade de Veterinária, da Universidade de Córdoba, verificou-se que os cavalos suspeitos de estarem afetados pela DNME, devido à sua história pregressa e aos sinais clínicos que evidenciavam, apresentavam lesões neurológicas de diferente natureza e gravidade. Estas eram consistentes com atrofia neurogénica centrofascicular; alterações centrais indicativas de degenerescência e reinervação; excessiva variabilidade do tamanho celular com alteração do tamanho dos diâmetros celulares; aumento muito significativo dos fatores de atrofia, fraca reação oxidativa e aumento da coloração histoquímica glicolítica. Estes dados recolhidos, permitiram aos anatomopatologistas concluir que as lesões identificas nestes equinos eram compatíveis de doença do neurónio motor.

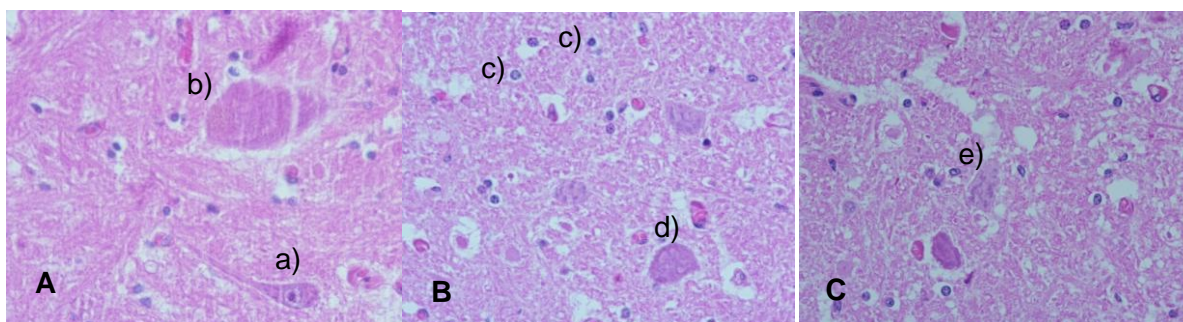
3.5. Exame *Postmortem*

No exame *postmortem*, realizado ao equino sujeito a eutanásia, a nível macroscópico, verificou-se atrofia muscular grave da parede abdominal, zonas de fibrina no peritoneu e coloração amarelada do mesentério.

Segundo o relatório final referente à análise histopatológica de fragmentos tecidulares do equino sujeito a eutanásia, enviado pelo Laboratório de Anatomia-Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, verificou-se que na região dos cornos ventrais da medula espinhal os corpos neuronais evidenciavam cromatólise, assumindo perfil circular devido ao edema. Alguns neurónios exibiam acumulação de pigmento finamente granular acastanhado, compatível com lipofuscina. Identificou-se ainda a presença de neurónios com cromatina dispersa, cariorrexis e discretas imagens de edema axonal na substância branca (região ventral).

Pelo que, o quadro histopatológico observado foi sugestivo de doença do neurónio motor.

Figura 11. Aspetos histopatológicos do corno ventral da medula espinhal do “equino 8” (H&E x 400) (H. Pissarra, comunicação pessoal, Novembro 14, 2013 – Publicação autorizada)



Legenda. Em A) observa-se: a) neurónio normal, b) acumulação de pigmento finamente granular acastanhado, compatível com lipofuscina; em B) observa-se: c) células da microglia, d) neurónio com cromatólise assumindo um perfil circular devido a edema; em C) observa-se: e) núcleo de neurónio em cariorrexis e presença de neurónios com cromatina dispersa.

De acordo com o relatório do Departamento de Anatomia Patológica Comparada, da Faculdade de Veterinária, da Universidade de Córdoba, na análise histopatológica realizada às amostradas colhidas durante o exame *postmortem* efetuado ao equino sujeito a eutanásia identificaram-se lesões microscópicas no plexo braquial de tumefação axonal e degenerescência da bainha de mielina em algumas fibras nervosas, enquanto a maioria apresentava características histopatológicas normais.

No caso do plexo lombosagrado, verificou-se degenerescência walleriana grave em muitas fibras nervosas, formando um material homogéneo e ligeiramente acidófilo devido à degenerescência de axónios e fibras de mielina.

Nos diferentes segmentos da medula espinhal (cervical, torácico e lombosagrado) observaram-se lesões correspondentes a pequenos focos hemorrágicos situados na substância cinzenta, afetando especialmente os segmentos cervical e lombar.

Alguns neurónios motores apresentavam cromatólise e acumulação de pigmento acastanhado em pequenas gotas compatíveis com lipofusцина.

Grupos de fibras mielínicas, no segmento da medula espinhal torácico e lombar, revelaram a presença de tumefação axonal e degenerescência da bainha de mielina. Também foi possível identificar proliferação das células de glia e fenómenos de satelitismo, principalmente nos segmentos torácico e lombar, sendo neste último onde se verificaram as lesões mais extensas, de entre as anteriormente referidas.

A nível do tronco cerebral observaram-se zonas de neurónios normais alternadas com neurónios com sinais de cromatólise moderada e ocasionalmente degenerescência neuronal e satelitose.

O diencéfalo e cerebelo apresentaram características histopatológicas normais.

As alterações neurológicas observadas foram compatíveis com doença do neurónio motor.

3.6. Estimativa da quantidade de vitamina E presente em alimentos compostos e alimentos compostos complementares disponíveis no mercado português

Com base no rótulo de cada AC, recolheu-se o valor da quantidade de vitamina E que é aditivada por cada quilograma de alimento, obtendo-se uma estimativa da quantidade de vitamina E que estes alimentos disponibilizam, como indicado na tabela 5.

Tabela 5. Quantidade de vitamina E aditivada em alimentos compostos para equinos, considerando diferentes gamas de 3 marcas distintas, disponíveis no mercado português.

Alimento Compostos (AC)	Gama Baixa (manutenção) (Vitamina E UI/kg)	Gama Alta (competição) (Vitamina E UI/kg)	Poldros (Vitamina E UI/kg)
AC 1	130	700	400
AC 2	30	150	175
AC 3	140	750	300

Os produtos de GB normalmente são aconselhados pelos fabricantes para equinos com necessidades diárias de α -tocoferol reduzidas, sendo suficientes para regimes de manutenção e com pouca atividade física. Por outro lado, produtos considerados de GA são aconselhados para equinos com necessidades de α -tocoferol elevadas, como por exemplo cavalos que praticam exercício físico intenso regularmente ou cavalos com regimes alimentares deficientes do ponto de vista nutricional.

Com base no rótulo de cada ACC, recolheu-se o valor da quantidade de vitamina E que é fornecida por cada dose diária recomendada pelo fabricante do respectivo produto, obtendo-se a tabela 6. Verificou-se que a quantidade de vitamina E disponível em cada dose de ACC, de acordo com o respetivo fabricante, é igual em 2 produtos e ligeiramente superior noutro.

Tabela 6. Quantidade de vitamina E fornecida em cada dose diária (recomendação de acordo com o respetivo rótulo), de 3 ACC disponíveis no mercado português.

Alimento Compostos Complementares (ACC)	Quantidade de Vitamina E por dose (UI)/diária
ACC 1	2.250
ACC 2	2.000
ACC 3	2.000

3.6.1. Comparação da quantidade de vitamina E estimada previamente que é disponibilizada por alguns AC, quando fornecidos a cavalos com diferentes níveis de actividade física de acordo com o sugerido pelo National Research Council (2007).

Tabela 7. Estimativa da quantidade de vitamina E fornecida pelo regime alimentar constituído por feno (qualidade média – 14 mg de α -tocoferol / MS) e por diferentes alimentos compostos, considerando 2 cavalos com diferentes necessidades diárias de α -tocoferol.

Tipo de cavalo	Quantidade de α -tocoferol no feno (14mg/kg MS)	Alimento Composto (AC1)		Alimento Composto 2 (AC2)		Necessidade diária de α -tocoferol (NRC 2007)
		Gama Baixa (130 UI/kg)	Gama Alta (700 UI/kg)	Gama Baixa (30 UI/kg)	Gama Alta (150 UI/kg)	
Cavalo M (3kg a.c./dia)	153,5 UI	<u>390 UI</u> Total: 543,5 UI	<u>2100 UI</u> Total: 2253,5 UI	<u>90 UI</u> Total: 243,5 UI	<u>450 UI</u> Total: 603,5 UI	<u>500 UI</u>
Cavalo D (4,5kg a.c./dia)	152,1 UI	<u>585 UI</u> Total: 737,1 UI	<u>3150 UI</u> Total: 3302,1 UI	<u>405 UI</u> Total: 557,1 UI	<u>675 UI</u> Total: 827,1 UI	<u>900 UI</u>

Legenda. Cavalo M: cavalo em manutenção, 500kg PV, assumindo uma necessidade diária de 1 UI de α -tocoferol /kg PV e uma ingestão diária de MS na ordem dos 2 % PV (NRC, 2007); Cavalo D: cavalo de desporto, nível moderado, 500kg PV, assumindo uma necessidade diária de 1,8 UI de α -tocoferol /kg PV e uma ingestão diária de MS na ordem dos 2,25 % PV(NRC, 2007).

Na realização deste exercício, consideraram-se 2 cavalos de 500 kg de PV, com diferentes exigências em α -tocoferol, em função do nível de esforço físico. O “cavalo M” representa um cavalo em regime de manutenção, com a necessidade diária de 1 UI de α -tocoferol /kg PV e uma ingestão diária de MS na ordem dos 2 % PV, como sugerido pelo NRC (2007). O “cavalo D” representa um equino que faz regularmente exercício físico de nível moderado, assumindo uma necessidade diária de 1,8 UI de α -tocoferol /kg PV e uma ingestão diária de MS na ordem dos 2,25 % PV, como sugerido pelo NRC (2007). A quantidade de AC que é fornecida a cada equino, foi considerada ao acaso, tentando aproximar-se do valor fornecido numa situação real. Partiu-se do princípio que a forragem corresponde a um feno de qualidade média, o qual fornece cerca de 14mg de α -tocoferol /kg MS. Uma vez que a forragem corresponde a uma fonte natural de vitamina E, com base na legislação em vigor (European Union Register of Feed Additives, 2013), corresponde a 20,86 UI de RRR- α -tocoferol / kg de MS.

A quantidade de vitamina E fornecida pelo feno foi calculada com base na quantidade de feno que os cavalos ingerem diariamente, assumindo que esta corresponde à diferença entre o valor total de MS que estes ingerem e o valor de MS fornecida através do alimentos composto.

Os AC utilizados no exercício foram os AC 1 e 2 presentes no mercados português, avaliados anteriormente. Ao longo de todos os cálculos realizados para obter a estimativa da quantidade de vitamina E fornecida por estes AC, apenas se considerou a quantidade de vitamina E indicada no respetivo rótulo, a qual corresponde à forma sintética que é adicionada pelos fabricantes. Assim, obtiveram-se os valores indicados na tabela 7. que se encontram sublinhados.

Somando a quantidade de vitamina E que é fornecida pelo AC, à quantidade que é fornecida no feno, para cada cavalo obtém-se o valor total de vitamina E ingerida diariamente, caso sejam alimentados com estes alimentos nas proporções indicadas.

Os valores correspondentes à quantidade total de vitamina E ingerida, em dietas compostas por AC de GB estão assinalados a castanho, ao passo que os valores correspondentes a dietas compostas por AC de GA estão a cor verde, com o objetivo de facilitar a leitura dos dados.

Realizados todos os cálculos necessários e após análise cuidada, na qual apenas se considerou a quantidade total de vitamina E que os animais ingerem, observa-se que: no caso do “cavalo M”, o regime alimentar composto pelo AC2 – GB o valor de α -tocoferol (243,5 UI) ingerido diariamente, fica muito abaixo do aconselhado (500 UI) pelo NRC (2007). No regimes compostos por AC1 – GB (543,5 UI) e AC2 – GA (603,5 UI), a quantidade de α -tocoferol fornecida é suficiente para suprimir as necessidades sugeridas, no entanto encontra-se pouco acima do recomendado.

O “cavalo D”, apesar de ingerir maior quantidade de alimento tem necessidades antioxidantes acrescidas. Neste caso, apenas o regime alimentar composto por AC1 – GA, consegue fornecer a quantidade de vitamina E necessária para uma animal com as características mencionadas.

4. DISCUSSÃO

Os equinos diagnosticados com DNME que compõem a amostra deste estudo antes de serem encerrados em boxe, estavam no campo com acesso a pastagem e eram suplementados com AC. Quando estabulados, estes foram alimentados diariamente com o mesmo AC e palha de má qualidade. Este tipo de manejo alimentar foi identificado noutros casos de DNME (Mohammed et al., 2007; Reed et al., 2010) e corrobora a história típica dos casos de DNME reportados anteriormente que inclui falta de acesso ou acesso limitado a pastagem verde (Furr & Reed, 2008).

Durante o período de estabulação (Tabela 3.), a quantidade de vitamina E que os equinos estavam a ingerir provavelmente era apenas a disponível no AC, pois a forragem era de muito má qualidade. Os 4 kg de AC que cada cavalo consumia diariamente forneciam 68 UI de α -tocoferol, de acordo a estimativa da quantidade de vitamina E efectuada com base nas indicações do respetivo rótulo. Mesmo considerando o valor de cerca de 202 UI, calculado anteriormente, a quantidade de vitamina E ingerida era bastante inferior ao mínimo de 1 UI de α -tocoferol/kg PV/dia aconselhado na literatura (NRC, 2007).

A quantidade de α -tocoferol adicionado ao AC seria baixa e insuficiente para prevenir a carência de vitamina E e posterior desenvolvimento de DNME no caso de os cavalos não terem acesso a forragem verde (Divers, Cummings, et al., 2006). Outro ponto relevante prende-se com o fato da vitamina E adicionada aos AC ser de origem sintética, a qual tem cerca de menos 36% de actividade biológica e propriedades antioxidantes menos potentes do que a vitamina E de origem natural (Pagan, 2009; Finno & Valberg, 2012).

No presente estudo, como referido anteriormente, o “equino 2” foi o que esteve menos tempo estabulado até manifestar sinais clínicos associados à DNME, 14 meses, enquanto o “equino 7” foi o que demorou mais tempo, cerca de 36,5 meses. Considerando todos os indivíduos da amostra, em média estiveram 22,8 meses estabulados e a ingerir alimentos pobres em vitamina E antes de apresentarem um quadro clínico coincidente com DNME. Ou seja, o período em que estes cavalos estiveram a ingerir pouca vitamina E até ao momento em que manifestaram sintomas de DNME foi sensivelmente semelhante ao determinado noutros trabalhos realizados, em que se verificou que os equinos desenvolveram DNME naturalmente, quando sujeitos a dietas pobres em vitamina E durante pelo menos 18 meses (Furr & Reed, 2008; Finno et al., 2010). Em 4 cavalos da nossa amostra (“equino 1”, “equino 2”, “equino 3” e “equino 5”) o período entre o momento de estabulação e a manifestação de sinais clínicos foi inferior a 17 meses. Esta situação pode ser justificada pelo facto dos

poldros em regime extensivo se encontrarem agrupados em lotes consoante a idade, o AC ser distribuído em simultâneo a todos os elementos do grupo e o encabeçamento do local ser elevado. Nestes grupos de animais existem fatores comportamentais e hierárquicos que dão origem a que os animais dominantes ingiram maior quantidade de AC face aos restantes (Waring, 2003). Assim, para os indivíduos na base da hierarquia a principal fonte de vitamina E é a erva da pastagem. Nos períodos em que não há erva disponível, ficam totalmente dependentes da vitamina E fornecida no AC. Nestes casos, provavelmente há uma diminuição mais acentuada dos níveis plasmáticos de α -tocoferol, pois normalmente os poldros que não são dominantes, ingerem menos AC. Os cavalos deste estudo poderiam estar a ingerir menos AC do que os companheiros de manada, logo menor quantidade de vitamina E. Os níveis plasmáticos de α -tocoferol estariam relativamente baixos e quando passaram do campo para o regime de estabulação onde a privação de vitamina E foi maior, a DNME desenvolveu-se de forma mais rápida.

Em animais alimentados de forma individual é fácil calcular a quantidade de AC que ingerem. No entanto, equinos que se encontram em manada, caso o AC seja distribuído de forma simultânea a todos os indivíduos, a quantidade ingerida por cada indivíduo vai ser diferente e difícil de calcular. Em Portugal, a distribuição de AC nos animais que se encontram na pastagem em simultâneo por todo o grupo, é uma prática comum, principalmente em manadas de éguas e piaras de poldros, os quais têm necessidades de α -tocoferol elevadas.

Na propriedade onde se encontravam os cavalos afetados, a quantidade de pastagem com sistema de regadio poderia ser insuficiente para combater o elevado encabeçamento do local e o clima mediterrânico com pouca pluviosidade. Assim, apesar dos equinos se encontrarem no campo, não tinham disponibilidade de erva fresca durante uma parte considerável do ano.

Todas estas condições sustentam a hipótese dos animais estarem no campo até cerca dos 3 anos, mas ingerirem quantidades de vitamina E inferiores ao recomendado e com variações individuais (NRC, 2007).

Um ponto interessante é o facto da amostra do presente estudo ser apenas constituída por animais machos. A inexistência de fêmeas afetadas, numa coudelaria com tantos casos de DNME, pode ser explicada por estas tradicionalmente permanecerem no campo mesmo após os três anos de idade. Embora todo o efetivo da coudelaria fosse alimentado com o mesmo AC apenas se verificou a doença nos equinos que estavam estabulados. A quantidade de vitamina E que os animais extraíam da pastagem seria suficiente, juntamente com a fornecida no AC, para manter a concentração plasmática de α -tocoferol acima de 1 $\mu\text{g/ml}$ (Furr & Reed, 2008; Finno & Valberg, 2012) evitando assim o desenvolvimento de DNME.

Tal como sugerido por Frape (2004), na história destes casos de DNME verificou-se que nos dois anos seguintes à identificação do primeiro cavalo com sintomas compatíveis com DNME, surgiram mais equinos no mesmo local com alterações semelhantes. Este dado pode significar que no momento em que o primeiro equino começou a apresentar alterações clínicas mais cavalos eram portadores de DNME, contudo na forma subclínica caracterizada por menos de 30 % dos neurónios motores afectados e ausência de sinais clínicos (Divers, Mohammed, et al., 2006). Os equinos nestas condições possivelmente teriam algum grau de fraqueza muscular permanente que não foi detectado pelo proprietário e nem pelo equitador, tal como Divers, Mohammed, et al. (2006) relataram.

Quando os cavalos começaram a manifestar os primeiros sintomas de DNME tinham idades compreendidas entre os 4 e os 5 anos, o que está de acordo com o descrito. Na Europa verificou-se que a idade de início da doença varia entre os 2 e os 27 anos ao passo que nos Estados Unidos varia entre os 2 e os 23 anos (McGorum et al., 2006; Furr & Reed, 2008).

Os equinos afectados começaram por apresentar perda de peso e descoordenação motora. Este sinais clínicos inespecíficos muitas vezes apresentados em fases iniciais da DNME podem ser resultado de diversas entidades clínicas, o que leva Reed et al. (2010) a sugerir que doenças tais como botulismo, MPE, miopatia por armazenamento de polissacáridos e disautonomia equina, incorporem o diagnóstico diferencial em cavalos suspeitos. A inespecificidade da sintomatologia inicial característica de alguns casos de DNME pode ainda conduzir a que esta doença não seja considerada nos diagnósticos diferenciais realizados durante as primeiras abordagens, casos os clínicos não estejam alertados para a sua existência.

O quadro clínico que os cavalos afectados viriam a apresentar alguns meses após a manifestação dos primeiros sinais, seria no entanto bastante característico de DNME nomeadamente: perda de peso embora o apetite se mantivesse normal ou mesmo aumentado, membros concentrados em estação (postura de “base estreita”), elevação da cauda e galope com os membros pélvicos em simultâneo (Furr & Reed, 2008; Reed et al., 2010). O equino que viria a ser sujeito a eutanásia apresentava muita dificuldade em manter-se em estação e constantemente mudava a distribuição do seu peso corporal entre os membros pélvicos. Todos estes sintomas têm acompanhado muitos dos casos relatados na literatura (Furuoka, Hasegawa, Kobayashi, & Matsui, 1999; Palencia et al., 2005; Furr e Reed, 2008) e no seu conjunto tornam-se sugestivos de DNME (DeVilbiss et al., 2009).

Na abordagem aos casos do presente estudo poderia ter sido elaborado um exame neurológico mais exaustivo, uma vez que se trata de uma doença de carácter neurológico. Contudo a elevada perda de massa muscular devido às lesões nos NMI (DeLahunta & Glass, 2009), óbvia nos músculos quadríceps e glúteos, tal como indentificado noutros casos de DNME relatados anteriormente (Reed et al., 2010), levou a que inicialmente se suspeitasse de outras doenças sem ligação ao sistema nervoso. DeLahunta e Glass (2009)

salientam a importância de eliminar a presença de um problema ortopédico durante a interpretação de sinais clínicos provocados por lesões nos NMI.

Após uma pesquisa bibliográfica detalhada verificou-se que existe muita variação nos valores de referência, relativos aos parâmetros bioquímicos sanguíneos dos equinos, sugeridos por diferentes autores (Benders et al., 2005; Palencia et al., 2005; Reed et al., 2010; Taylor, et al., 2010).

Assim sendo optou-se por comparar os valores obtidos nas análises das amostras de sangue efetuadas com os que são mencionados em fontes bibliográficas e estudos recentes relativos à DNME.

Só foi possível obter o resultado das análises bioquímicas efetuadas a 6 dos 8 cavalos que compõem a nossa amostra, apesar de se saber que estes dois animais também foram sujeitos a colheita de sangue para análise.

Verificou-se que existe unanimidade por parte dos autores em considerar que em cavalos afetados pela DNME se verifica um aumento da atividade enzimática das enzimas AST e CK (Benders et al., 2005; Palencia et al., 2005; Reed et al., 2010; Taylor, et al., 2010), contudo são poucos os estudos que referem valores em concreto. Num trabalho realizado por Benders et al. (2005) com o objetivo de avaliar a tolerância à glucose e a função de transporte da membrana luminal do intestino em cavalos com DNME, foram considerados os seguintes valores de referência: AST <200 U/L, CK <275 U/L e LDH <420 U/L. Comparando estes com os resultados obtidos no nosso estudo, apenas o valor relativo à LDH do “Equino 7” se encontra abaixo dos valores indicados. Contudo, considerando duas fontes bibliográficas recentes, Taylor, et al. (2010) que sugere valores de AST 102 -350 U/L, CK 110 - 250 U/L e LDH 225 - 700 U/L e Reed et al., 2010 que sugere valores de AST 185 -375 U/L, CK 100 - 470 U/L e LDH 225 - 700 U/L, os valores sugerido por Benders et al. (2005) parecem estar um pouco abaixo do que é considerado aceitável.

Efetuando a comparação dos valores sugeridos por estes autores com os resultados do presente estudo (Tabela 4.), verificou-se que só em alguns casos houve elevação ligeira a moderada da atividade das enzimas AST, CK e LDH (Tabela 4.).

Este resultado vai ao encontro dos estudos consultados (Benders et al., 2005; Palencia et al., 2005; Reed et al., 2010; Taylor, et al., 2010) durante a realização deste trabalho, os quais também revelaram diferenças consideráveis na atividade enzimática de vários grupos de cavalos afetados pela DNME. Seria interessante ter-se efetuado a comparação dos valores obtidos em relação à atividade das enzimas AST, CK e LDH com a gravidade dos sinais clínicos apresentados pelos equinos, uma vez que permitiria perceber se as alterações obtidas no perfil bioquímico são mais acentuadas nos cavalo com sinais clínicos mais graves.

Nenhum dos cavalos com suspeita de DNME foi sujeito a exame oftalmológico. No entanto a literatura refere que 50 % dos cavalos afetados têm alterações características do fundo do olho causadas pela acumulação de ceróide/lipofuscina no EPR (Reed et al., 2010).

De acordo com a experiência de médicos veterinários que se têm dedicado ao estudo do impacto da acumulação de lipofuscina na função visual, tem-se verificado que poucos cavalos apresentam queixa visual, independentemente da gravidade das lesões oftalmoscópicas (Riis et al., 1999; Finno et al., 2010). O desconhecimento desta condição também pode contribuir para uma diminuição da realização de exames oftalmoscópicos em equinos suspeitos de estarem afectados pela DNME.

As análises histopatológicas realizadas aos tecidos colhidos com recurso a biópsia e no exame *postmortem*, este último apenas para um caso, desempenharam um papel determinante na conclusão do diagnóstico. Tal como reportado na literatura (Valentine et al., 1998; Furr & Reed, 2008; Bedford et al., 2013), a realização deste tipo de exame é fundamental em casos suspeitos de DNME, porque os sinais clínicos apresentados por equinos afectados, assim como alguns parâmetros laboratoriais alterados, embora sugestivos de DNME são insuficientes para efetuar um diagnóstico definitivo (DeVilbiss et al., 2009).

A nível das biópsias musculares realizadas, os resultados apresentados no relatório emitido pelo Departamento de Anatomia Patológica Comparada da Faculdade de Veterinária da Universidade de Córdoba, vão de encontro ao relatado por Valentine et al. (1998) e Bedford et al. (2013). Identificou-se a presença de atrofia neurogénica, alterações centrais indicativas de degenerescência e reinervação e variabilidade do tamanho celular.

O diagnóstico definitivo só foi alcançado num caso, pois apenas um equino foi sujeito a eutanásia e posterior colheita de tecido nervoso para análise. Nos dois laboratórios (Departamento de Anatomia Patológica Comparada, da Faculdade de Veterinária, da Universidade de Córdoba e Laboratório de Anatomia-Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa) onde as amostras foram avaliadas obtiveram-se resultados semelhantes. Verificou-se a presença de edema nos corpos neuronais dos cornos ventrais da medula espinhal, acumulação de pigmento compatível com lipofuscina, degenerescência walleriana de fibras nervosas e degenerescência de axónios. Estas lesões são transversais a vários estudos onde se identificaram as lesões histopatológicas apresentadas por cavalos com DNME (Furuoka et al., 1999; Divers, Mohammed, et al., 2006; Sasaki et al., 2006; Furr & Reed, 2008) e permitiram afirmar com 100 % de certeza que o cavalo em causa era portador de DNME.

No caso de animais que possam desenvolver DNME por serem alimentados com alimentos pobres em vitamina E, devem ser realizados doseamentos periódicos da concentração sorológica de α -tocoferol sem esquecer os fatores que podem influenciar os resultados (De la Rúa-Domènech et al., 1997; Finno & Valberg, 2012). O resultado do doseamento da

concentração plasmática de α -tocoferol contribui não só para o diagnóstico presuntivo de DNME, como para o despiste de outras doenças, como a disautonomia equina (de la Rúa-Domènech et al., 1997). Os médicos veterinários que realizem colheitas sanguíneas para este fim devem estar alertados sobre o correcto acondicionamento das amostras antes da análise, uma vez que a exposição à luz, o contacto com a borracha do tubo de recolha e a hemólise podem provocar alteração dos resultados obtidos. Devem ainda ter consciência da necessidade de realizar amostras múltiplas quando se pretende determinar com exatidão a concentração plasmática de α -tocoferol de um determinado animal (Finno & Valberg, 2012). Outra opção a ser sugerida aos proprietários é a realização da colheita por biópsia de uma amostra do músculo sacrococcígeo dorsal medial ou do ramo ventral do nervo acessório para posterior análise histopatológica. Valentine et al. (1998) aconselham a biópsia deste músculo por ser constituído predominantemente por fibras musculares tipo I, mais suscetíveis de oxidação, e tem a vantagem de ser um local facilmente acessível. Estes testes são exames com elevada especificidade e sensibilidade (Bedford et al., 2013) que apresentam um contributo muito significativo no diagnóstico da DNME (Furr & Reed, 2008). Apesar de não existirem muitos estudos que abordem o acompanhamento de cavalos com DNME após vários anos do diagnóstico inicial da doença, foi descrito que dependendo da gravidade e duração da doença, estes podem permanecer estáveis 1 a 6 anos (DeVilbiss et al., 2009). Estudos desta natureza podem ser bastante úteis na compreensão da progressão da doença e da utilização futura de cavalos que tenham sido diagnosticados com DNME. Dois equinos da amostra sobreviveram durante o primeiro ano e continuam vivos 7 anos após o início dos primeiros sintomas. Estes cavalos não estão sujeitos a qualquer tipo de actividade física, o que certamente contribuirá para evitar agravamento do seu quadro clínico e recaídas que possam conduzir à sua morte ou necessidade de eutanásia, como referido noutros casos (Furr & Reed, 2008; Reed et al., 2010). Os cavalos que permanecem vivos apresentam estabilização da sintomatologia clínica associada à DNME. No entanto, estes continuam com dificuldade em ganhar massa muscular e com a locomoção alterada. Estes animais, incluem assim 40 % dos casos de DNME que demonstram estabilização dos sinais clínicos sem melhorias associadas (Furr & Reed, 2008; Reed et al., 2010). El-Assaad et al. (2012) desenvolveu um trabalho experimental na tentativa de determinar se em casos de DNME ocorrem alterações na proteína TDP-43, tal como se verifica na ELA em humanos. Uma vez que a DNME é uma doença multifactorial e difícil de diagnosticar *antemorten*, a identificação de um marcador específico que permita efectuar o diagnóstico definitivo de DNME em animais suspeitos, contribuirá não só para identificar casos suspeitos como para actuar precocemente ao nível do manejo alimentar de forma a cessar a progressão da doença. Posteriormente à identificação dos casos de DNME que compõem este trabalho Finno, Lamas, Curto, & Spier (2012) desenvolveram um estudo piloto em Portugal composto por 20

equinos exclusivamente de raça Lusitana pertencentes a 7 coudelarias portuguesas, com o objectivo de identificar a sua concentração sorológica de α -tocoferol. Um dos equinos que incorporou o estudo foi o “equino 4” da amostra deste estudo, o qual apresentou uma concentração de 0.7 $\mu\text{g/ml}$ de α -tocoferol no soro. Tal como esperado, este valor encontrava-se abaixo das 2 $\mu\text{g/ml}$ de α -tocoferol recomendadas (Finno & Valberg, 2012).

Para além disso, verificou-se que 75 % dos equinos avaliados apresentavam concentrações sorológicas de α -tocoferol deficientes ($1.27 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$), todos estes se encontravam em regime de estabulação permanente. Por outro lado, dos 5 indivíduos que apresentaram concentração de α -tocoferol acima de 2 $\mu\text{g/ml}$, dois encontravam-se estabulados e três em regime de pastoreio. Um ponto bastante significativo foi o fato de apenas a coudelaria de origem dos equinos do nosso trabalho, apresentarem história de casos de DNME associada à carência de vitamina E. Assim sendo, este resultado obtido pode significar que os cavalos das restantes coudelarias com baixa concentração de α -tocoferol no plasma podem ser portadores de DNME na forma subclínica. Neste trabalho verificou-se que os cavalos com carência de vitamina E eram alimentados com feno de má qualidade armazenado por longos períodos de tempo e AC com adição de fontes sintéticas de vitamina E em proporções inadequadas. Os resultados levantaram bastante preocupação em relação ao manejo alimentar de equinos em Portugal, na medida em que podem refletir o problema de várias coudelarias portuguesas (Finno et al., 2012).

Torna-se por isso bastante importante sensibilizar criadores e equitadores no sentido de saberem interpretar a informação disponibilizada no rótulo de um AC ou de um ACC. Os proprietários devem ser informados acerca dos alimentos mais ricos em vitamina E e das condições que conduzem à diminuição da sua concentração de α -tocoferol nas forragens, pois só assim se conseguem melhorar as práticas de manejo alimentar e evitar doenças associadas às mesmas, tais como a DNME. Muitas vezes, estas pessoas pensam que estão a fornecer uma dieta equilibrada, com os nutrientes necessários para suprimir as necessidades nutricionais diárias dos seus cavalos, mas na verdade não é o que se verifica. Situação semelhante ocorreu com os equinos que constituem a amostra do nosso estudo, pois o proprietário achava que estava a cobrir as necessidades nutricionais ao adicionar diariamente AC no regime alimentar dos seus animais.

Variações individuais entre cavalos e variações ao nível da própria pastagem dificultam que seja sugerido um período de tempo de pastoreio específico de modo a garantir a ingestão de vitamina E suficiente para manter a concentração plasmática de α -tocoferol dentro de parâmetros considerados normais (McGorum et al., 2006). No entanto, está descrito que qualquer cavalo que ao longo do ano tenha menos de 3 meses de acesso a pastagem pode apresentar concentração plasmática de vitamina E inferior ao normal (McGorum et al., 2006). Esta indicação pode ser considerada como um “indicador superficial” de forma a que os proprietários assegurem períodos de acesso a pastagem ou forragem verde

suficientemente longos para permitir o aporte necessário de vitamina E. Em Portugal muitos cavalos são alimentados por forragens mal acondicionadas em períodos longos de tempo (Finno et al., 2012) e sabe-se que a radiação ultravioleta e o calor promovem oxidação (Müller et al., 2007). Em forragens armazenadas a concentração de α -tocoferol pode ser 10 vezes inferior à inicial (Pagan, 2009) e a fermentação e o crescimento de fungos devido à humidade dos próprios alimentos baixa significativamente a concentração de vitamina E nos mesmos (NRC, 1989).

A fontes naturais de vitamina E a que os equinos têm acesso são a erva fresca, os feno, algumas matérias primas dos AC, principalmente os cereais e a luzerna, e alguns ACC que contenham vitamina E de origem natural (Sauvant et al., 2002; Pagan, 2009). No caso dos fenos, para que estes forneçam uma quantidade de vitamina E considerável, têm de ser de boa qualidade (Sauvant et al., 2002), o que raramente se verifica no nosso país. Na realidade, em Portugal ainda existe uma grande percentagem dos cavalos alimentados com palha e fenos de má qualidade, os quais não fornecem vitamina E ou fornecem uma quantidade residual. Por outro lado, a quantidade de α -tocoferol disponível nas matérias primas dos AC (“rações”) é bastante reduzida face aquela que é fornecida pela erva verde da pastagem (Sauvant et al., 2002). Como tal, quando se pretende obter vitamina E natural, deve-se considerar a pastagem como fonte principal.

A produtividade de uma determinada pastagem varia em função de se tratar de uma pastagem de sequeiro ou uma pastagem de regadio. No caso de Portugal, como sugerido por Salgueiro (1982), sendo um país com pouca pluviosidade, a quantidade anual de matéria seca produzida por unidade de área é bastante superior no caso das pastagens de regadio.

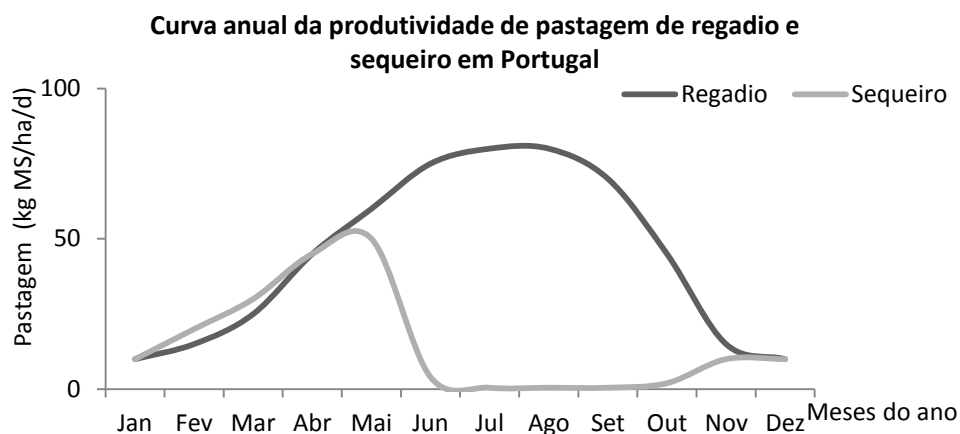
No caso de pastagens de sequeiro, normalmente constituídas por espécies de ciclo vegetativo anual, a produtividade de matéria seca aumenta no início da primavera, Fevereiro – Março, mas com o aumento da temperatura nos meses de Maio – Junho, verifica-se uma diminuição acentuada. Neste tipo de pastagens nos meses quentes de verão a disponibilidade de alimento verde é nula. No outono, o início das chuvas originam o crescimento das plantas, mas a quantidade de MS é mais reduzida, em comparação com a verificada na primavera. No inverno, devido às baixas temperaturas as plantas crescem menos, logo existe menor disponibilidade de pastagem, tanto no regime de regadio como no regime de sequeiro.

Nas pastagens de regadio consegue-se prolongar a produtividade, atingindo esta o pico no verão, quando há calor e, neste caso, disponibilidade de água. A diminuição da produtividade inicia-se no final do verão, Setembro – Outubro.

A avaliação da produtividade anual de pastagem é de extrema importância, na medida em que permite ter uma noção das épocas em que os animais com acesso a pastagem têm maior ou menor disponibilidade de vitamina E. Este conhecimento permite aos criadores

efetuarem uma gestão mais eficiente dos recursos alimentares, reduzindo as despesas com a alimentação dos seus cavalos.

Gráfico 3. Produtividade anual de pastagens de sequeiro e regadio em Portugal (M. Fradinho, comunicação pessoal, Outubro 30, 2013 - Adaptado de Salgueiro, 1982).



A amostra de AC e ACC para equinos avaliada foi bastante pequena, face à oferta disponível no mercado português. No entanto, o objetivo foi alcançado, pois esta avaliação passava por apresentar alguns exemplos de produtos disponíveis no mercado português e não efetuar um estudo exaustivo da quantidade de vitamina E que cada alimento comercial fornece.

Em relação aos AC (Tabela 5.) verificou-se que apesar de duas marcas indicarem nos rótulos dos seus produtos uma quantidade semelhante de vitamina E, adicionada a cada quilo de alimento de gamas equivalentes, uma outra marca apresentava valores bastantes inferiores. Esta situação pode exemplificar a diversidade da composição dos alimentos comerciais e a grande variação do seu valor nutricional. Para as 3 marcas consideradas, verificou-se que a gama aconselhada para poldros apresenta uma concentração de vitamina E superior à gama de manutenção da respetiva marca, enquanto a GA/competição era a que apresentava maior concentração de α -tocoferol. Essa situação ilustra a sensibilidade dos fabricantes em adicionar maior quantidade de vitamina E aos AC destinados a classes de cavalos com necessidade de α -tocoferol aumentada, como sendo os poldros e os cavalos sujeitos a exercício intenso (NRC, 2007; Pagan, 2009).

Nos ACC (Tabela 6.) avaliados verificou-se que a quantidade de vitamina E que cada um destes fornece é muito semelhante, variando entre 2.000 e 2.250 UI por dose. A utilização deste tipo de alimentos pode ser bastante útil no regime alimentar de cavalos com DNME em tratamento. Uma vez que o tratamento aconselhado para DNME passa pela suplementação com 5.000 – 7.000 UI de α -tocoferol/cavalo/dia (Reed et al., 2010), com

duas doses de um ACC com estas características, juntamente com o α -tocoferol que será fornecido na forragem e/ou no AC, consegue-se atingir a quantidade de α -tocoferol sugerida. Para efetuar os cálculos dos nutrientes fornecidos por um determinado alimento, são considerados os valores que se encontram indicados no rótulo do mesmo. Como tal é de extrema importância, que não se verifiquem irregularidades por parte dos fabricantes a nível da informação disponibilizada nos rótulos, sob pena de quem está a programar uma dieta ser induzido em erro.

A utilização de ACC ricos em vitamina E é uma excelente opção quando se pretende elevar a concentração de α -tocoferol no organismo. No entanto, muitos destes ACC também têm selénio (Se) na sua composição. Logo, quando se calcula a dose a fornecer, é importante não desprezar a concentração de Se. Embora seja um mineral que também desempenha funções antioxidantes (NRC, 1989; Reed et al., 2010), a necessidade diária de Se para um equino é reduzida pelo que pode atingir níveis tóxicos se a quantidade administrada não for a correta (NRC, 2007).

Verifica-se alguma variação entre autores, quanto aos valores referentes à quantidade diária de α -tocoferol aconselhada a ser fornecida em cada categoria de equinos de acordo com o nível de esforço físico (NRC, 2007; Pagan, 2009; Martin-Rosset, 2012). Tendo em conta que todos os equinos pertencentes à amostra são cavalos machos de raça Lusitana, o seu peso vivo adulto rondará os 500 kg (Associação Portuguesa de Criadores do Cavalo Puro Sangue Lusitano, 1989).

Tabela 8. Necessidades diárias de vitamina E, num cavalo de 500 kg de PV com diferentes níveis de esforço físico, de acordo com o recomendado pelo NRC (2007).

Nível de exercício físico	Ingestão diária de MS (% de PV)	UI de α -tocoferol /kg PV	UI de α -tocoferol para 1 cavalo de 500 kg
Manutenção	2	1	500
Baixo	2	1,6	800
Moderado	2,25	1,8	900
Elevado	2,5	2	1000

Tabela 9. Necessidades diárias de vitamina E, num cavalo de 500 kg de PV com diferentes níveis de esforço físico, de acordo com o recomendado pelo INRA (Martin-Rosset, 2012).

Nível de exercício físico	Ingestão diária de MS (kg)	UI de α -tocoferol para 1 cavalo de 500 kg
Manutenção	7,5 – 9,5	425
Baixo	10,0 – 12,5	560
Moderado	11,0 – 13,5	1020
Elevado	10,0 – 12,5	900

Existe pouca variação entre a quantidade de α -tocoferol sugerida, para cada categoria de esforço físico, no sistema de alimentação para equinos americano (NRC,2007) e no sistema francês (Martin-Rosset, 2012). Embora o NRC (2007), apresente as unidades referentes à ingestão diária de MS em % de PV e o INRA (Martin-Rosset, 2012) apresente em kg, a quantidade de MS aconselhada por ambos os sistemas é semelhante (2% de PV de um cavalo de 500 kg corresponde a 10 kg).

Como indicado anteriormente, a literatura refere que para além dos cavalos que desempenham atividades físicas intensas, éguas de criação e poldros têm necessidades diárias de α -tocoferol elevadas (NRC, 2007; Pagan, 2009; Martin-Rosset, 2012).

Tabela 10. Necessidades diárias de vitamina E, em éguas de 500 kg de PV, em diferentes momentos do ciclo reprodutivo (Adaptado de Martin-Rosset, 2012).

	Égua seca ou início de gestação	Égua gestante								Égua lactante					
		Meses de gestação								Meses de lactação					
		0-5	6	7	8	9	10	11		1	2	3	4	5	6
Necessidade diária de Vitamina E (UI)	480	480	660	660	660	700	740	780		660	710	710	660	600	490

Tabela 11. Necessidades diárias de vitamina E, em poldros de várias idades com perspetiva de atingirem 500 kg de PV na idade adulta (Martin-Rosset, 2012).

Idade (meses)	Peso médio durante o período (kg)	Necessidade diária de Vitamina E (UI)	Consumo de MS (kg)
3-6	173	440	4,5 - 6,5
6-12	260	580	6,0 - 8,0
18-24	410	555	8,0 - 10,5
30-36	478	585	8,5 - 11,0
36-42	493	645	9,5 - 12,0

Os criadores devem ter conhecimento que éguas fora da época reprodutiva ou início de gestação apresentam necessidade diária de α -tocoferol semelhante à indicada para animais em regime de manutenção. Por outro lado, com o desenrolar da gestação, sobretudo a partir do quinto mês, verifica-se um aumento crescente na necessidade diária de α -tocoferol, até ao final da gestação (Frape, 2004; Finno & Valberg, 2012).

Os poldros apresentam necessidades diárias de α -tocoferol muito próximas das sugeridas para equinos adultos em regime de manutenção. Esta situação é justificada pelo facto de se tratar de animais em crescimento e como tal terem necessidades nutricionais elevadas, nomeadamente de vitamina E (Frape, 2004; Martin-Rosset, 2012). A quantidade de vitamina

E necessária, vai aumentando com o passar da idade, pois os poldros vão crescendo e a quantidade de antioxidantes que deve ser fornecida aumenta.

Através do conhecimento adquirido durante a formação enquanto médico-veterinário e ao longo do período de estágio, comprova-se que a maior parte dos criadores pretende obter produtos nos primeiros meses de cada ano. Esta situação leva a que muitos éguas terminem as gestações em Fevereiro e Março. A disponibilidade de erva fresca na pastagem durante estes meses, varia em função das condições climatéricas verificadas nos meses anteriores. Contudo, tipicamente nos primeiros meses do ano a disponibilidade de erva ainda é reduzida (Salgueiro, 1982) e as éguas devem ser suplementadas com AC de forma a suprimir as exigências nutricionais características do último terço de gestação (Frape, 2004; Martin-Rosset, 2012).

Tal como referido anteriormente, muitos nutricionistas quando pretendem calcular a quantidade de α -tocoferol fornecida a uma equino num determinado regime alimentar, apenas têm em conta a vitamina E fornecida nos AC. Estes, apenas consideram os valores indicados nos respetivos rótulos, correspondentes às fontes sintéticas utilizadas na forma de aditivo (Pagan, 2009). Com a intenção de se realizar um exercício semelhante, avaliou-se a quantidade de vitamina E que pode ser ingerida por cada equino quando alimentado com os diferentes AC, considerando apenas o α -tocoferol disponibilizado por estes (Tabela 7.). De entre os 4 AC avaliados, tanto no “Cavalo M” como no “Cavalo D” apenas a dieta composta pelo AC1 – GA fornece vitamina E suficiente para satisfazer as necessidades consideradas. Embora estes resultados sejam fruto de um pequeno exercício de cálculo matemático, os AC considerados, correspondem a alimentos disponíveis no mercado português, utilizados por vários proprietários, podendo as doses de AC consideradas ilustrar casos reais. Esta situação demonstra que cavalos estabulados ou em paddocks sem acesso a pastagem verde, dependem do AC para ingerir vitamina E e com facilidade a quantidade fornecida poderá ficar abaixo do desejável.

4.2. Limitações do Estudo

As limitações do presente estudo estão sobretudo relacionadas com o desconhecimento dos níveis plasmáticos de α -tocoferol dos equinos afetados pela DNME. Uma vez que esta doença está amplamente associada à carência de vitamina E, teria sido bastante útil para comparação com os dados apresentados na literatura (Finno & Valberg, 2012), realizar doseamentos da concentração vitamina E no plasma dos cavalos afetados. O doseamento da quantidade de vitamina E no alimento também contribuiria com mais informação, permitindo quantificar o valor exato de α -tocoferol ingerido por cada cavalo. Contudo, sabe-se que o proprietário realizou diversas tentativas no sentido de analisar o AC em causa, mas

nenhuma das entidades contactadas efetuou o doseamento de α -tocoferol em AC para equinos.

Todos os cavalos pertencentes a este estudo, foram examinados na coudelaria de origem por diferentes médicos veterinários em regime de ambulatório. Na altura em que se registaram estes casos (2007-2009), os clínicos de equinos estavam pouco sensibilizados para a presença da DNME em Portugal.

Estas situações conduziram a que diferentes entidades tivessem realizado sucessivos registos do estado clínico e análises ao perfil bioquímico e hematológico até direcionarem o diagnóstico. Logo, não foi fácil obter um registo homogêneo dos dados de referentes a cada caso de DNME.

5. CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que a DNME, tal como no resto do Mundo, existe em Portugal.

A análise dos resultados obtidos permitiu concluir que efetivamente é difícil obter um padrão da sintomatologia clínica e do resultado das análises laboratoriais em equinos afetados pela DNME. A sintomatologia inicial inespecífica leva a que com facilidade esta doença possa ser confundida com outras doenças, principalmente se os clínicos e proprietários não estiverem alertados. Tratando-se de uma doença sem tratamento efetivo e com mau prognóstico, deve ser desenvolvido um trabalho de sensibilização junto de médicos veterinários, criadores e equitadores de forma a direcionarem esforços para prevenir a sua ocorrência. Em equinos com risco de desenvolverem DNME devem ser efectuados doseamentos da quantidade de α -tocoferol plasmática sempre que necessário. O diagnóstico final *in vivo* só deve ser efectuado após o resultado da análise histopatológica do músculo sacrococcígeo dorsal medial recolhido por biópsia.

Com a informação recolhida ao longo deste trabalho, concluiu-se que em cavalos estabulados alimentados com forragem e AC de fraca qualidade dificilmente se consegue fornecer vitamina E suficiente para suprimir as suas necessidades diárias. A equinos em regime de estabulação, bem como aqueles que apresentam necessidade diária de α -tocoferol elevada, como cavalos de desporto, poldros e éguas em reprodução, devem ser fornecidas fontes extra de vitamina E como ACC. As fontes de vitamina E naturais são a melhor opção para incrementar os níveis plasmáticos de α -tocoferol, como tal, proporcionar acesso a pastagem com erva fresca deve fazer parte do manejo alimentar, sempre que possível.

A análise de alguns AC, disponíveis no mercados português, permitiu concluir que existem variações bastante significativas na concentração de vitamina E em cada alimento.

Toda a pesquisa realizada juntamente com a simulação dos casos clínicos, permitiu ilustrar que pequenas variações na concentração de vitamina E por kg do AC fornecido originam diferenças acentuadas na quantidade total ingerida diariamente.

Em suma, com conhecimento da composição nutricional dos alimentos e gerindo os recursos disponíveis, nomeadamente ao nível da pastagem, é possível suprimir as necessidades de vitamina E com custos controlados.

BIBLIOGRAFIA

- Anexo I de 3 de Setembro de 2013, Regulation (EC) No 1831/2003, European Union Register of Feed Additives, Edition 70.
- Associação Portuguesa de Criadores do cavalo Lusitano (1989). *Padrão da Raça Lusitana*. Acedido em Nov. 4, 2013, disponível em: <http://www.cavalo-lusitano.com/pt/stud-book/padrao-da-raca>
- Bedford, H. E., Valberg, S. J., Firshman, A. M., Lucio, M., Boyce, M. K., & Trumble, T. N. (2013). Histopathologic findings in the sacrocaudalis dorsalis medialis muscle of horses with vitamin E-responsive muscle atrophy and weakness. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 242(8), 1127–1137.
- Benders, N. A., Dyer, J., Wijnberg, I. D., Shirazi-Beechey, S. P., & van der Kolk, J. H. (2005). Evaluation of glucose tolerance and intestinal luminal membrane glucose transporter function in horses with equine motor neuron disease. *American journal of veterinary research*, 66(1), 93–99.
- Bondo, T., & Jensen, S. K. (2011). Administration of RRR- α -tocopherol to pregnant mares stimulates maternal IgG and IgM production in colostrum and enhances vitamin E and IgM status in foals: Vitamin E to pregnant mares. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95(2), 214–222.
- Davis, J. L. (2011). Ocular Manifestations of Systemic Disease. In *Equine Ophtalmology* (2nd ed., pp. 443–469). St. Louis, Mo: Elsevier Saunders.
- De la Rúa-Domènech, R., Mohammed, H. O., Cummings, J. F., Divers, T. J., De Lahunta, A., & Summers, B. A. (1997). Association between plasma vitamin E concentration and the risk of equine motor neuron disease. *The Veterinary Journal*, 154(3), 203–213.
- Deaton, C. M., & Marlin, D. J. (2005). Reactive oxygen species and antioxidants – a war of nutrition. *The Veterinary Journal*, 169(1), 7–9.
- DeLahunta, A., & Glass, E. (2009). *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology*. St. Louis, Mo.: Saunders Elsevier.
- DeVilbiss, B. A., Mohammed, H. O., & Divers, T. J. (2009). Perception of Equine Practitioners Regarding the Occurrence of Selected Equine Neurologic Diseases in the Northeast Over a 10-Year Period. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(4), 237–246.
- Divers, T. J., Cummings, J. E., de Lahunta, A., Hintz, H. F., & Mohammed, H. O. (2006). Evaluation of the risk of motor neuron disease in horses fed a diet low in vitamin E and high in copper and iron. *American Journal of Veterinary Research*, 67(1), 120–126.
- Divers, T. J., Mohammed, H. O., Hintz, H. F., & de Lahunta, A. (2006). Equine Motor Neuron Disease: A Review of Clinical and Experimental Studies. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 5(1), 24–29.
- Duberstein, K. J., Johnson, S. E., McDowell, L. R., & Ott, E. A. (2009). Effects of vitamin E supplementation and training on oxidative stress parameters measured in exercising horses. *Comparative Exercise Physiology*, 6(01), 17.

- El-Assaad, I., Bari, J. A., Yasuda, K., Divers, T. J., Summers, B. A., Lahunta, A., & Mohammed, H. (2012). Differential expression of TAR DNA-binding protein (TDP-43) in the central nervous system of horses afflicted with equine motor neuron disease (EMND): a preliminary study of a potential pathologic marker. *Veterinary Research Communications*.
- Finno, Carrie J., Eaton, J. S., Aleman, M., & Hollingsworth, S. R. (2010). Equine protozoal myeloencephalitis due to *Neospora hughesi* and equine motor neuron disease in a mule. *Veterinary Ophthalmology*, 13(4), 259–265.
- Finno, C.J., Higgins, R. J., Aleman, M., Ofri, R., Hollingsworth, S. R., Bannasch, D. L., Reilly, C.M., Madigan, J. E. (2011). Equine Degenerative Myeloencephalopathy in Lusitano Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(6), 1439–1446.
- Finno, C.J., & Valberg, S. J. (2012). A Comparative Review of Vitamin E and Associated Equine Disorders. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(6), 1251–1266.
- Finno, C., Lamas, L. P., Curto, T. C. e, & Spier, S. (2012). Lusitano horses in Portugal without access to pasture are at risk of having low serum levels of vitamin E: a pilot study. In M. Saastamoinen, M. J. Fradinho, A. S. Santos, & N. Miraglia (Eds.), *Forages and grazing in horse nutrition* (pp. 341–342). Wageningen: Wageningen Academic Publishers.
- Fiorellino, N. M., Lamprecht, E. D., & Williams, C. A. (2009). Absorption of Different Oral Formulations of Natural Vitamin E in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(2), 100–104.
- Frape, D. L. (2004). *Equine nutrition and feeding* (3rd ed.). Oxford, UK; Ames, IA: Blackwell Pub.
- Furr, M., & Reed, S. M. (2008). *Equine neurology*. Ames, Iowa: Blackwell Pub.
- Furuoka, H., Hasegawa, M., Kobayashi, Y., & Matsui, T. (1999). Peripheral nerve lesions in a case of equine motor neuron disease. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 61(5), 557–560.
- Higgins, J. K., Puschner, B., Kass, P. H., & Pusterla, N. (2008). Assessment of vitamin E concentrations in serum and cerebrospinal fluid of horses following oral administration of vitamin E. *American Journal of Veterinary Research*, 69(6), 785–790.
- Jackson, C. A., Lahunta, A., Cummings, J. F., Divers, T. J., Mohammed, H. O., Valentine, B. A., & Hackett, R. P. (1996). Spinal accessory nerve biopsy as an ante mortem diagnostic test for equine motor neuron disease. *Equine Veterinary Journal*, 28(3), 215–219.
- Junqueira, L. C. U., Carneiro, J., Abrahamsohn, P. A., Zorn, T. M. T., & Santos, M. F. dos. (2004). *Histologia básica: texto e atlas*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.
- Kane, E., Stuart, R. L., & Pusterla, N. (2010). Influence of Source and Quantity of Supplemental Vitamin E on Equine Serum and Cerebrospinal Fluid α -Tocopherol and Its Implication for Neurologic Diseases (Vol. 56, pp. 343–347).
- Kirschvink, N., Moffarts, B. de, & Lekeux, P. (2008). The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*, 177(2), 178–191.

- Kyles, K. W., McGorum, B. C., Fintl, C., Hahn, C. N., Mauchline, S., & Mayhew, I. G. (2001). Electromyography under caudal epidural anaesthesia as an aid to the diagnosis of equine motor neuron disease. *The Veterinary record*, 148(17), 536–538.
- Ledwith, A., & McGowan, C. M. (2010). Muscle biopsy: a routine diagnostic procedure. *Equine Veterinary Education*, 16(2), 62–67.
- Lofstedt, J., & Ikede, B. O. (1994). Motor neuron disease in a quarter horse from Nova Scotia. *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne*, 35(8), 507–509.
- Lorenz, M. D. (2004). *Handbook of veterinary neurology* (4th ed.). Philadelphia, PA: Saunders.
- Martin-Rosset, W. (2012). *Nutrition et alimentation des chevaux: nouvelles recommandations alimentaires de l'INRA*. Versailles: Éd. Quae.
- Mayhew, J. (2009). *Large animal neurology* (2^a Edição), Chichester, U.K.; Ames, Iowa: Wiley-Blackwell Pub.
- McDowell, L. R. (1989). *Vitamins in animal nutrition: comparative aspects to human nutrition*. San Diego: Academic Press.
- McGorum, B. C., Mayhew, I. G., Amory, H., Deprez, P., Gillies, L., Green, K., Mair, T. S., Nollet, H., Wijnberg, I. D., Hahn, C. N. (2006). Horses on pasture may be affected by equine motor neuron disease. *Equine Veterinary Journal*, 38(1), 47–51.
- Mohammed, H. O., Cummings, J. F., Divers, T. J., Valentine, B., de Lahunta, A., Summers, B., Farrow, B. R., Trembicki-Graves, K., Mauskopf, A. (1993). Risk factors associated with equine motor neuron disease: a possible model for human MND. *Neurology*, 43(5), 966–971.
- Mohammed, H. O., Divers, T. J., Summers, B. A., & de Lahunta, A. (2007). Vitamin E deficiency and risk of equine motor neuron disease. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(1), 17.
- Mohammed, H. O., Starkey, S. R., Stipetic, K., Divers, T. J., Summers, B. A., & de Lahunta, A. (2008). The role of dietary antioxidant insufficiency on the permeability of the blood-brain barrier. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 67(12), 1187–1193.
- Mohammed, H. O., Divers, T. J., Kwak, J., Omar, A. H., White, M. E., & de Lahunta, A. (2012). Association of oxidative stress with motor neuron disease in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 73(12), 1957–1962.
- Monkhouse, S. (2006). *Cranial nerves functional anatomy*. Cambridge, UK; New York c: Cambridge University Press.
- Moore, A., Collatos, C., Ortenburger, A., Illanes, O., & Ikede, B. (1994). Motor neuron disease in a horse. *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne*, 35(8), 522.
- Müller, C. E., Möller, J., Jensen, S. K., & Udén, P. (2007). Tocopherol and carotenoid levels in baled silage and haylage in relation to horse requirements. *Animal Feed Science and Technology*, 137(1-2), 182–197.

- National Research Council (U.S.). (1989). *Nutrient requirements of horses* (5th rev. ed.). Washington, D.C: National Academy Press.
- National Research Council (U.S.). (2007). *Nutrient requirements of horses* (6th rev. ed.). Washington, D.C: National Academies Press.
- Nell, B., & Walde, I. (2010). Posterior segment diseases. *Equine veterinary journal. Supplement*, (37), 69–79.
- Pagan, J. D. (2009). *Advances in equine nutrition 4*. 4. Nottingham: Nottingham Univ. Press.
- Pagan, J., Kane, E., & Nash, D. (2005). Form and source of tocopherol affects Vitamin E status in thoroughbred horses (pp. 101–102). Presented at the Equine Nutrition Conference Hanover.
- Palencia, P., Quiroz-Rothe, E., & Rivero, José Luís L. (2005). New insights into the skeletal muscle phenotype of equine motor neuron disease: a quantitative approach. *Acta neuropathologica*, 109(3), 272–284.
- Petersson, K. H., Burr, D. B., Gomez-Chiarri, M., & Petersson-Wolfe, C. S. (2010). The influence of vitamin E on immune function and response to vaccination in older horses. *Journal of Animal Science*, 88(9), 2950–2958.
- Polack, E. W., King, J. M., Cummings, J. F., de Lahunta, A., Divers, T. J., & Mohammed, H. O. (1998). Quantitative assessment of motor neuron loss in equine motor neuron disease (EMND). *Equine veterinary journal*, 30(3), 256–259.
- Polack, E. W., King, J. M., Cummings, J. F., Mohammed, H. O., Birch, M., & Cronin, T. (2000). Concentrations of trace minerals in the spinal cord of horses with equine motor neuron disease. *American Journal of Veterinary Research*, 61(6), 609–611.
- Pusterla, N., Puschner, B., Steidl, S., Collier, J., Kane, E., & Stuart, R. L. (2010). -tocopherol concentrations in equine serum and cerebrospinal fluid after vitamin E supplementation. *Veterinary Record*, 166(12), 366–368.
- Reed, S. M., Bayly, W. M., & Sellon, D. C. (2010). *Equine internal medicine*. St. Louis, MO: Saunders/Elsevier.
- Rey, A. I., Segura, J., Arandilla, E., & Lopez-Bote, C. J. (2013). Short- and long-term effect of oral administration of micellized natural vitamin E (D- -tocopherol) on oxidative status in race horses under intense training. *Journal of Animal Science*, 91(3), 1277–1284.
- Riis, R. C., Jackson, C., Rebhun, W., Katz, M. L., Loew, E., Summers, B., Cummings, J., Lahunta, A., Divers, T., Mohammed, H. (1999). Ocular manifestations of equine motor neuron disease. *Equine Veterinary Journal*, 31(2), 99–110.
- Robin, M., Malbon, A., Ricci, E., McGowan, C., & Malalana, F. (2013). Reduced tongue tone associated with degeneration of the hypoglossal nerve nucleus in a horse with equine motor neuron disease: Reduced tongue tone in a case of EMND. *Equine Veterinary Education*
- Salgueiro, T. (1982). *Pastagens e Forragens*. (2ª edição). Clássica Editora.
- Santos, A. S., & Silvestre, A. M. (2008). A Study of Lusitano Mare Lactation Curve with Wood's Model. *Journal of Dairy Science*, 91(2), 760–766.

- Sasaki, N., Yamada, M., Morita, Y., Furuoka, H., Itoh, M., Satoh, M., & Yamada, H. (2006). A case of equine motor neuron disease (EMND). *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 68(12), 1367–1369.
- Sauvant, D., Perez, J.-M., Tran, G., & Institut national de la recherche agronomique (France), A. française de zootechnie. (2002). *Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage: porcs, volailles, bovins, ovins, caprins, lapins, chevaux, poissons*. Paris: INRA.
- Secombe, C. J., & Lester, G. D. (2012). The role of diet in the prevention and management of several equine diseases. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1-2), 86–101.
- Siciliano, P. D., Parker, A. L., & Lawrence, L. M. (1997). Effect of dietary vitamin E supplementation on the integrity of skeletal muscle in exercised horses. *Journal of animal science*, 75(6), 1553–1560.
- Soffler, C. (2007). Oxidative Stress. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 23(1), 135–157.
- Taylor, F. G. R., Brazil, T. J., & Hillyer, M. H. (2010). *Diagnostic techniques in equine medicine a textbook for students and practitioners describing diagnostic techniques applicable to the adult horse*. Edinburgh; New York: Saunders.
- Terrasa, A. M., Guajardo, M. H., Marra, C. A., & Zapata, G. (2009). α -Tocopherol protects against oxidative damage to lipids of the rod outer segments of the equine retina. *The Veterinary Journal*, 182(3), 463–468.
- Thomson, C. (2012). *Veterinary neuroanatomy: a clinical approach*. Edinburgh: Saunders Elsevier.
- Valentine, B. A., Divers, T. J., Murphy, D. J., & Todhunter, P. G. (1998). Muscle biopsy diagnosis of equine motor neuron disease and equine polysaccharide storage myopathy. *Equine Veterinary Education*, 10(1), 42–50.
- Van der Kolk, J. H., Rijnen, K. E. P. M., Rey, F., de Graaf-Roelfsema, E., Grinwis, G. C. M., & Wijnberg, I. D. (2005). Evaluation of glucose metabolism in three horses with lower motor neuron degeneration. *American journal of veterinary research*, 66(2), 271–276.
- Waring, G. H. (2003). *Horse behavior* (2nd ed.). Norwich, N.Y: Noyes Publishing.
- Wijnberg, I. D., Back, W., Jong, M., Zuidhof, M. C., Belt, A. J. M., & Kolk, J. H. (2010). The role of electromyography in clinical diagnosis of neuromuscular locomotor problems in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 36(8), 718–722.
- Wilkie, D. A. (2011). Diseases of the Ocular Posterior Segment. In *Equine Ophthalmology* (2nd ed., pp. 367–396). St. Louis, Mo: Elsevier Saunders.
- Williams, C A, & Carlucci, S. A. (2006). Oral vitamin E supplementation on oxidative stress, vitamin and antioxidant status in intensely exercised horses. *Equine veterinary journal. Supplement*, (36), 617–621.
- Williams, Carey A., & Burk, A. O. (2012). Antioxidant Status in Elite Three-Day Event Horses during Competition. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1–8.
- Wong, D. M., Moore, R. M., & Brockus, C. W. (2012). Mechanisms of oxidative injury in equine disease. *Compendium (Yardley, PA)*, 34(8), E6.